

Deteksjon og lokalisasjon av CKS2-proteinet i ulike cellesyklusfaser i livmorhalskarsinomer

Masteroppgave i farmakologi for mastergraden i farmasi

Moigan Mirzaei



Utført ved Avdeling for strålingsbiologi ved Institutt for
kreftforskning Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF.

Farmasøytisk institutt ved Universitet i Oslo: Vår/ Høst 2007 og Vår
2008

Forord

Denne masteroppgaven i farmakologi ble utført ved Avdeling for Strålingsbiologi som er en del av Institutt for kreftforskning ved Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF, i perioden januar.2007 til mai.2008, masteroppgaven er en del av graden Master i Farmasi, ved Farmasøytisk institutt på Universitet i Oslo.

Jeg vil først takke min hovedveileder, Heidi Lyng for hjelp med planlegging av forsøk, bearbeiding av data, tilbakemeldinger underveis og i det hele tatt utfordre meg til å utføre mitt beste under hele perioden.

Jeg vil takke alle på forskningsgruppen for hjelp og gode innspill underveis, og spesielt Debbie Svendsrud, Kirsten Landsverk og Trond Stokke for hjelp og tilrettelegging av det praktiske laboratoriearbeidet. Jeg vil også takke min andre veileder Kirsten Skarstad for kommentarer og innspill på slutten av skriveprosessen.

Til slutt, men ikke minst vil jeg takke min samboer Anders, og familie for all støtte og oppmuntring gjennom hele studiet, inkludert utførelsen av masteroppgaven.

Oslo, mai 2008

Moigan Mirzaei

Sammendrag

Høyt uttrykk av *CKS2*-genet er funnet i livmorhalskarsinomer og er relatert til dårlig overlevelse. Det er også vist at *CKS2* er involvert i cellyklus. På bakgrunn av dette var målene i denne masteroppgaven å studere mengde og lokalisasjon av proteinet i ulike cellyklusfaser. *CKS2*-mengden gjennom cellyklus ble funnet ved bruk av flowcytometri. Lokalisasjonen av proteinet ble funnet ved bruk av konfokalmikroskopi der ulike snitt av cellen kunne studeres. Forsøk ble utført på intakte celler (metanolfikserte celler), og ekstraherte celler der cellemembranen var lysert ved bruk av en detergentbuffer. Ekstraherte celler ble anvendt for å undersøke om *CKS2* var assosiert i kjerneområdet i de ulike cellyklusfasene.

CKS2-mengden økte fra G_1 -til og med G_2 - fase der cellene viste en dobling av *CKS2*-innholdet. Dette er i samsvar med doblingen av DNA-innhold og cellediameter fra G_1 - til - G_2 -fase i prolifererende celler. I intakte celler holdt *CKS2*-nivået seg relativt stabilt fra G_2 -til M-fase. Konsentrasjonen av *CKS2* var dermed konstant gjennom cellyklus i disse cellene. I de ekstraherte cellene ble *CKS2*-mengden i M- fase redusert til G_1 -nivå. Dette kan indikere at *CKS2* i M-fase befinner seg i cytoplasma og dermed reduseres når cellemembranen lyses. Forskjellen i *CKS2*-innhold mellom intakte og ekstraherte celler i M-fase var signifikant etter utført t-test for HeLa, men ikke for SiHa.

CKS2 ble funnet lokalisert i foci i kjernen i interfasecellene i intakte og ekstraherte HeLa og SiHa. *CKS2* ble ikke detektert i nukleoli i disse cellene. I M-fase var *CKS2*-foci ikke assosiert med kjerneområdet, men funnet i cytoplasma i intakte og ekstraherte HeLa og SiHa. Medianen av antall foci i per celle i midtsnittsbildene i de ekstraherte interfasecellene var 11 for HeLa og 12 for SiHa. Prosentandelen celler uten foci blant disse cellene var 10,53 % for HeLa og 5,26 % for SiHa. Noe *CKS2* ble også detektert diffust fordelt i interfase og M-fase. Det ble også detektert celler uten *CKS2*. De *CKS2*-negative cellene som var runde og hadde kjernemembranen i behold, kan ha vært i interfase eller profase. Konfokalmikroskopi på sorterte celler viste at de *CKS2*-negative cellene ikke var i en spesifikk fase av interfase.

CKS2 i foci i interfasecellene kan ha vært for store til å ekstraheres. Disse cellene hadde også kjernemembranen i behold i motsetning til mitosene, dette kan ha bidratt til at *CKS2*-

foci hovedsakelig ble funnet i kjernen i interfase, mens CKS2-foci var lokalisert i cytoplasma i mitosene. Muligens er CKS2 bundet i foci i kjernen i interfase, mens bindingen opphører i M-fase. CKS2-foci kan imidlertid også være ubundet i kjernen i interfasecellene

CKS2-foci funnet i denne masteroppgaven besto antakeligvis av flere CKS2 formet som heksamere. CKS2 bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset i G₂-/M-faseovergangen i humane celler. Syklin-B1/CDK1-komplekset er vist å være lokalisert i cytoplasma i interfase, for deretter å translokaliseres til kjernen i sen profase. CKS2 kan ha ulike konformasjoner i interfase i HeLa og SiHa, der det diffust fordelte CKS2 bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset i G₂-/M-overgangen, mens CKS2 i foci antakeligvis har en annen funksjon. Konformasjonsendringen antydnet i flowcytometriforsøkene var lokalisert i kjernen, der CKS2 var hovedsakelig i foci i interfase, men diffust fordelt i mitosene.

CKS2 i foci kan også fungere som lagringsplass i kjernen i G₁-, S-, og G₂-fase. I M-fase kan CKS2 i foci ha en ukjent funksjon, eller fungere som lagringsplass i cytoplasma.

Forkortelser og symboler

APC	Anafasepromoterende kompleks
BP	Band Pass/ båndpass
CAK	CDK-aktiverende kinase
CDC25C	Celledelingssyklus 25 homolog C-proteinet
CDK	Syklinavhengig kinase
CDKN1A (p21)	Syklinavhengig kinaseinhibitor-1A
CDKN3	Syklinavhengig kinaseinhibitor-3
CIN	Cervical intraepithelial Neoplasia
CKI	Syklinavhengig kinaseinhibitor
CKS1	CDC28-protein kinaseregulatorisk subenhet-1
CKS2	CDC28-protein kinaseregulatorisk subenhet-2
DNA	Deoxyribonykleinsyre
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FITC	Fluoresceinisothiocyante
FSC	Forward Scatter
HPV	Humant papillomavirus

KLSM	Konfokal laserskanning mikroskopi
LP	Long Pass/ langpass
ml	milliliter
mM	millimolar
MPF	Mitosepromoterende faktor
mRNA	Messenger RNA
PBS	Fosfat-bufret saltvannsoppløsning
PE	Phycoerythrin
PH3	Fosforylert histon-H3
PLK1	Pololignende kinase 1, involvert i regulering av celsyklus
PKMYT1	Proteinkinase membranassosiert tyrosin og threonin 1 (PKMYT1)
PMT	Fotomultiplikator
<i>RB1</i>	Tumorsuppressorgen som koder for RB1,
rpm	Runder per minutt (sentrifugeringshastighet)
SP	Short Pass
SSC	Side Scatter
Thr14	Threonin 14
Thr161	Threonin 161
Tyr15	Tyrosin 15

<i>TP53</i>	Tumorsuppressorgen som koder for proteinet tumor protein TP53
UV	Ultrafiolett
WEE1	WEE1 tyrosin kinase
μl	mikroliter
μM	mikromolar

Innledning

I 2006 fikk 294 kvinner diagnostisert livmorhalskreft i Norge [1]. Behandlingen av invasiv sykdom består i dag av bestråling og/eller kirurgi [2]. Problemet med strålebehandlingen er at strålingen også ødelegger omkringliggende friskt vev. Det er derfor ønskelig med behandlingsalternativer som angriper kreftsvulsten spesifikt for å unngå disse skadene, og ulike komplikasjoner som kan oppstå som resultat av det ødelagte vevet. For å oppnå dette må det detekteres noe som er annerledes i kreftceller, i forhold til normale celler. Analyse av genuttrykk i en klinisk studie, identifiserte *CKS2* som et av 98 gener som var oppregulert i livmorhalskreft i forhold til normalt vev, og en annen studie har vist at høyt uttrykk av *CKS2* i kreftsvulsten, fører til dårligere sjanse for progresjonsfri overlevelse[3, 4]. Årsaken til disse funnene er ukjent.

CKS2 antas å være involvert i overgangen mellom G₂- og M- fase [5, 6]. Proteinet er vist å være assosiert med syklinavhengig kinase-1 og antas å være regulert ulikt i ulike cellesyklusfaser [5, 7]. Kunnskapen om at proteinet er overuttrykt hos mange pasienter med livmorhalskreft, kan brukes i utviklingen av et nytt legemiddel som angriper celler med høyt *CKS2*-mengde, men for at dette skal være mulig må *CKS2* sin rolle i reguleringen av cellesyklus være bedre kartlagt, og derfor er fokus i denne oppgaven rettet mot *CKS2*.

Formålet med masteroppgaven var dermed:

1. å finne uttrykk av *CKS2*-proteinet i ulike cellesyklusfaser i HeLa- og SiHa-celler.
2. å finne intracellulær lokalisasjon av *CKS2*-proteinet i de ulike cellesyklusfaser i HeLa- og SiHa-celler.
3. å kartlegge i hvilken grad *CKS2*-proteinet er assosiert i kjerneområdet i ulike cellesyklusfaser i HeLa- og SiHa-celler.

Tidligere studier utført i prosjektgruppen har vist hvordan uttrykket av *CKS2*-genet og fordelingen av *CKS2*-proteinet i HeLa- og SiHa-celler, endres etter behandling med ulike stråledoser [8, 9]. Dette er cellelinjer fra to typer livmorhalskreft som viser ulik grad av apoptose etter strålebehandling [10]. I denne masteroppgaven ble de samme cellelinjene anvendt. Flowcytometri ble brukt for å studere *CKS2*-mengden i ulike faser av cellesyklus,

fordi denne metoden kan anvendes til å måle proteinmengde og fasestatus samtidig. Konfokalmikroskopi ble brukt for å studere intracellulær lokalisasjon av proteinet, i både usorterte og sorterte celler. Alle forsøkene ble utført på både intakte(metanolfikserte) og ekstraherte(detergentekstraherte) celler.

Innholdsfortegnelse

FORORD	2
SAMMENDRAG	3
FORKORTELSER OG SYMBOLER	5
INNLEDNING	8
INNHALDSFORTEGNELSE	- 10 -
1. BIOLOGISK BAKGRUNN	- 14 -
1.1 CELLESYKLUS	- 14 -
1.2 REGULERING AV CELLESYKLUS	- 17 -
1.3 KREFTUTVIKLING OG LIVMORHALSKREFT	- 20 -
1.3.1 Kreftutvikling.....	- 20 -
1.3.2 Human papillomavirus i utviklingen av livmorhalskreft.....	- 21 -
1.3.3 Epidemiologi og behandling av livmorhalskreft	- 22 -
1.4 CKS2	- 23 -
1.4.1 CKS2 i samspill med andre proteiner i cellesyklus.....	- 23 -
1.4.2 CKS2 funksjon.....	- 25 -
2. METODISK BAKGRUNN	- 26 -
2.1.1 Celledyrking av adherente celler	- 26 -
2.2 FLUORESCENS	- 26 -
2.3 FLOWCYTOMETRI	- 29 -
2.3.1 Væskesystemet	- 30 -
2.3.2 Det optiske systemet	- 31 -
2.3.3 Det elektroniske systemet og signaldeteksjon	- 33 -

2.3.4	<i>Dataanalyse</i>	- 35 -
2.3.5	<i>Kompensasjon</i>	- 36 -
2.3.6	<i>Cellesortering</i>	- 36 -
2.4	FLUORESCENSMIKROSKOPI OG KONFOKALMIKROSKOPI	- 38 -
2.4.1	<i>Fluorescensmikroskopi</i>	- 38 -
2.4.2	<i>Konfokal laserskanning mikroskopi (KLSM)</i>	- 38 -
2.5	ANTISTOFFBINDING	- 40 -
3.	MATERIALER OG METODER	- 43 -
3.1	CELLELINJER	- 43 -
3.1.1	<i>HeLa cellelinjen</i>	- 43 -
3.1.2	<i>SiHa cellelinjen</i>	- 43 -
3.2	HØSTING OG TELLING AV CELLER	- 43 -
3.2.1	<i>Celledyrking</i>	- 43 -
3.2.2	<i>Splitting av celler</i>	- 43 -
3.2.3	<i>Telling av celler med Coulter counter</i>	- 44 -
3.3	FORSØKSOPPSETT	- 45 -
3.4	FIKSERING OG FARGING AV CELLER	- 46 -
3.4.1	<i>Preparering av intakte celler</i>	- 46 -
3.4.2	<i>Preparering av ekstraherte celler</i>	- 46 -
3.4.3	<i>Farging av celler for flowcytometri og konfokalmikroskopi</i>	- 47 -
3.5	FLOWCYTOMETRIFORSØK TIL KVANTITATIVE MÅLINGER AV CKS2	- 48 -
3.5.1	<i>Rådataanalyse</i>	- 49 -
3.5.2	<i>Cellesortering</i>	- 52 -
3.6	KONFOKALMIKROSKOPIFORSØK	- 52 -

3.6.1	Kvantifisering av CKS2-foci.....	- 54 -
3.7	T-TEST.....	- 54 -
4.	RESULTATER	- 55 -
4.1	FLOWCYTOMETRI	- 55 -
4.1.1	DNA-fordelingen i HeLa og SiHa	- 55 -
4.1.2	Beregning av DNA-indeks.....	- 56 -
4.1.3	CKS2-innhold i cellene gjennom cellesyklus.....	- 58 -
4.1.4	CKS2-innhold i gjennomsnitt relatert til G_1 -nivå.....	- 60 -
4.2	KONFOKALMIKROSKOPI	- 62 -
4.2.1	Lokalisasjon av CKS2 i HeLa og SiHa	- 62 -
4.2.2	Kvantitativ analyse av fociantallet.....	- 66 -
4.3	KONFOKALMIKROSKOPERING ETTER CELLESORTERING.....	- 68 -
4.3.1	Deteksjon av CKS2 i ulike cellesyklusfaser i HeLa.....	- 68 -
4.3.2	Deteksjon av CKS2 i ulike cellesyklusfaser i SiHa.....	- 70 -
5.	DISKUSJON	- 73 -
	METODE	- 73 -
5.1.1	Modellsystemet.....	- 73 -
5.1.2	Fiksering og farging av cellene.....	- 73 -
5.1.3	Konfokalmikroskopi på sorterte celler.....	- 74 -
5.2	BIOLOGI	- 75 -
5.2.1	CKS2-innhold gjennom cellesyklus i HeLa og SiHa.....	- 75 -
5.2.2	Lokalisasjon av CKS2 i HeLa og SiHa	- 75 -
6.	KONKLUSJON	- 79 -
7.	REFERANSER.....	- 80 -

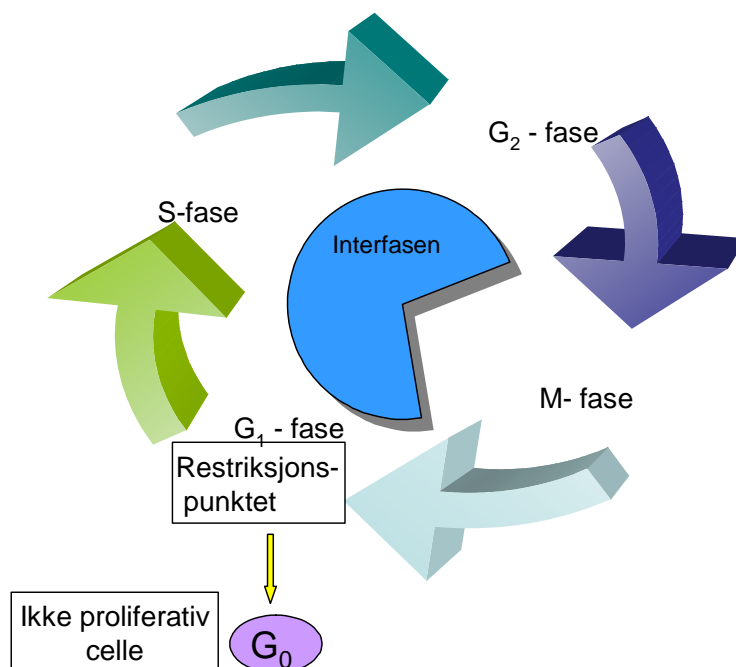
8.	VEDLEGG.....	- 85 -
----	--------------	--------

1. Biologisk bakgrunn

1.1 Cellesyklus

En celle replikeres ved en ordnet sekvens av hendelser, der cellen blant annet fordobler sitt innhold og deles i to datterceller [11]. Samlet kalles replikasjonen for cellesyklus.

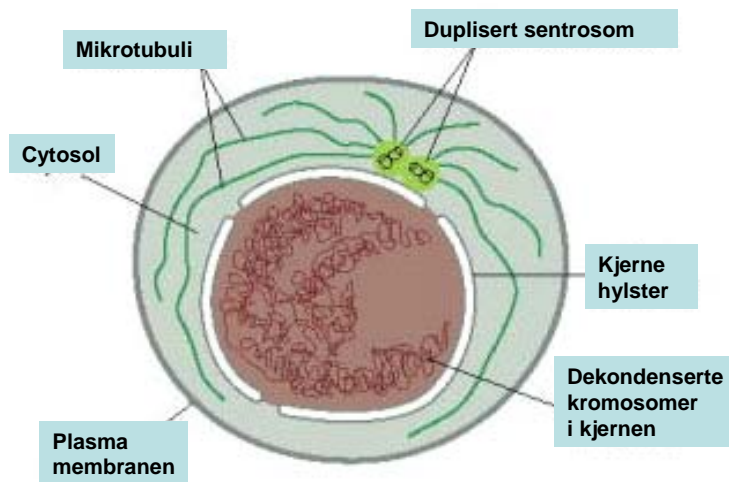
Cellesyklus inndeles i 4 faser kalt G_1 - (gap1), S- (syntese) G_2 - (gap2) og M - fase (mitose) som vist i figur.1.1-1. Cellesyklus kan også grovt inndeles i interfase og M-fase. Interfase inkluderer G_1 -, S-, og G_2 - fase.



Figur 1.1-1 De fire fasene i cellesyklus G_1 -, S-, G_2 - og M-fase. Etter celledeling i M-fase bestemmes det ved restriksjonspunktet i G_1 -fase, om cellene går videre i cellesyklus eller går til G_0 -fase. Celler i G_0 -fase er ikke prolifererende.

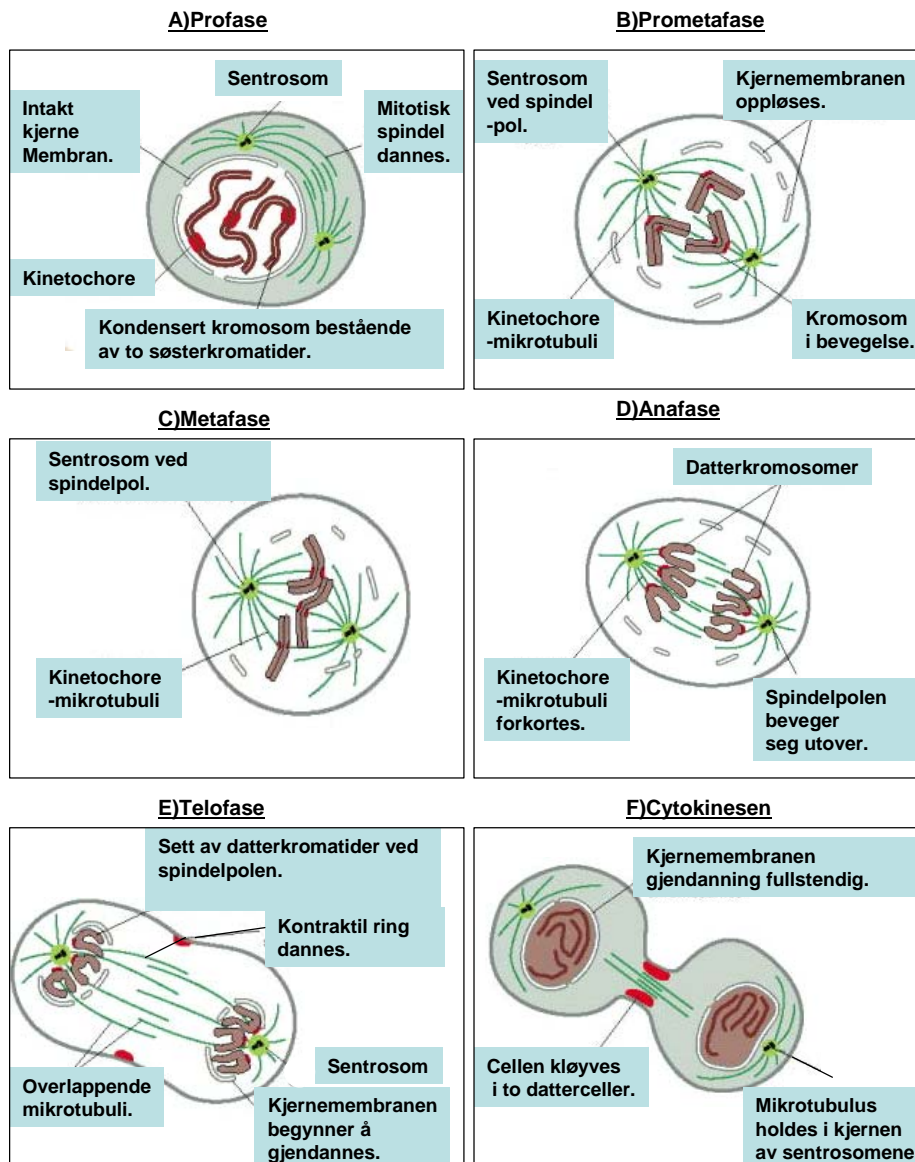
Ved restriksjonspunktet i G_1 - fase avgjøres det om cellen skal gå til G_0 -fase, eller gå videre i cellesyklus [11]. G_0 - celler har ingen vekstfaktorer og kan derfor ikke vokse eller dele seg [12]. Restriksjonspunktet er defekt i kreftceller, dette medfører at kreftcellene har en evne til å dele seg ukontrollert, i fravær av vekstfaktorene som er nødvendig for at normale celler skal dele seg [13]. I G_1 - fase der cellen forberedes til S- fase, dannes enzymene som er kritiske for DNA-replikasjonen og histon- duplisering [14]. Dette tar generelt mellom 6-24

timer [12]. I G₁-/S-overgangen dupliseres sentrosomene og S-fasen starter med at enzymene, involvert i DNA-duplikasjonen øker og beveger seg inn i kjernen [14]. Der replikeres DNA av de omlag 40 000 genene som er lokalisert på de 23 kromosomparene hver celle inneholder. Dette tar rundt 6-8 timer[12]. G₂-fase er også en forberedelsesfase og enzymene som er viktige for M- fasen dannes i G₂-fase. Dette kan ta flere timer. Et kjent G₂- produkt er mitosepromoterende faktor (MPF) [12]. DNA og sentrosomene må være replikert for at cellen skal inntre M-fase [11]. En celle klar for M-fase er vist i figur 1.1-2.



Figur 1.1-2. Her er en illustrasjon av en celle klar for M-fasen. DNA er replikert og sentrosomene duplisert. Revidert fra [11].

M-fasen inndeles videre i pro-, meta-, ana-, telo-fase, og cytokinesen, der kjernen og cytoplasma deles i to datterceller vist i figur 1.1-3[12, 14]. Fasen varer i under en time [11].



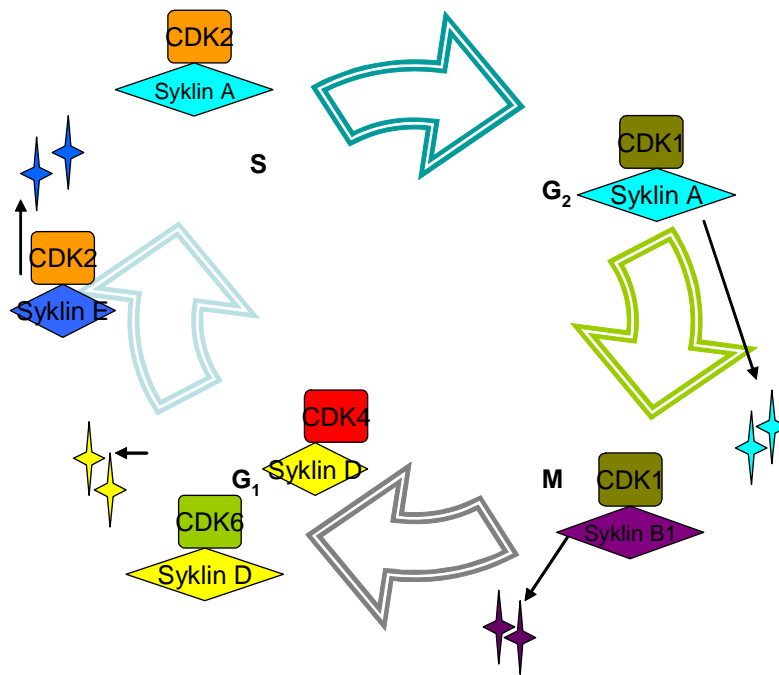
Figur 1.1-3. M-fasens underfaser inkluderer A)profase, B)prometafase, C)metafase, D)anafase, E)telofase og F)cytokinesen. Revidert fra [11].

Transporten av proteiner i cellen styres av cytoskjelettet som også støtter opp den skjøre cytoplasmamembranen [11]. Cytoskjelettet består av tre cytoskjelettfilamenter, intermediat - filamenter, aktinfilamenter og mikrotubuli. Sentrosomene er det organiserende sentrum av mikrotubuli og til sammen kalles de en spindelpol. Herfra dirigerer mikrotubuli den cellulære trafikken og bestemmer blant annet organellers posisjon i cellen. I profase kondenseres

kromosomene bestående av søsterkromatider, nukleoli oppløses, og bipolar spindel utvikles ved at sentrosomene vandrer til hver sin pol. Mikrotubuli konverteres fra få til mange lengre og mer dynamiske mikrotubuli. Disse griper fast i kinetochorene i prometafase og kinetochore-mikrotubuli dannes. Kjernemembranen oppløses ved at enzymkomplekser fosforylerer kjernemembranen. Kromosomene lokaliseres i ekvatorialplanet i metafase, og søsterkromatidene fester seg til spindelpolene. I anafase beveger spindelpolene seg utover og sentrosomene deler seg. Søsterkromatidene dras til hver sin pol, slik at det dannes to sett med datterkromosomer. Kromosomene dekondenseres i telofase, og kjernemembranen begynner å gjendannes rundt hvert sitt sett av kromosomer. En kontraktile ring dannes fra cytoskjelettet som i cytokinesen hjelper til å dele cellen i to datterceller, ved at cytoplasma kløyves og kjernemembranen gjendannes fullstendig.

1.2 Regulering av cellyklus

Faseovergangene i cellyklus reguleres hovedsakelig av syklinavhengige kinaser (CDK) [15]. Det er lagt inn flere sjekkpunkter i cellyklus, der spesifikke gener og proteiner kontrollerer at forberedelsene for neste cellyklusfase blir riktig utført. Sjekkpunktene fungerer hovedsakelig ved tre faser/faseoverganger i cellyklus, dette er G_1 -/S-overgangen, S-fase og G_2 -/M-overgangen [16]. Et DNA-enkeltråddbrudd vil for eksempel sette i gang prosesser som forhindrer replikasjon av celler med ødelagt DNA, slik at cellene får bedre tid til å reparere dette. Slik begrenses blant annet mutasjoner og antallet celler som går i apoptose (programmert celledød). For at cellyklus skal opprettholdes må ulike proteiner aktiveres ved hvert sjekkpunkt. Når disse aktiveres reguleres de underordnede proteinene i en kaskadereaksjon. Sykliner aktiverer CDK ved å binde til kinasen, og danne et syklin/CDK-kompleks. Ulike komplekser utøver sin funksjon i ulike cellyklusfaser som vist i figur 1.2-1.



Figur 1.2-1 Cellesyklus reguleres hovedsakelig av syklinavhengige kinaser (CDK), som aktiveres av sykliner. Syklin/CDK-komplekset som dannes under aktiveringen oppløses når de har utført sine oppgaver i cellesyklus.

CDK aktiveres ved fosforylering i sitt aktive sete [12]. Syklin-D øker i tidlig til midtfase av G₁-fase, og regulerer CDK4 og CDK6. Retinoblastoma1-proteinet (RB1) er et substrat for dette komplekset, som fosforyleres og dermed aktiveres [15]. Syklin-D/CDK4-komplekset utløser syntesen av syklin-E i sen G₁-fase, som igjen aktiverer CDK2, syklin-A-produksjonen og DNA-syntese [12]. Syklin-E/CDK2-komplekset spiller en viktig rolle i G₁-fase og G₁/S-overgangen. Syklin-A/CDK2-komplekset er involvert i S- fase, mens i sen G₂-fase og til og med tidlig M-fase dannes syklin-A/CDK1-komplekset der cellene går fra G₂-til M-fase. M-fase reguleres av syklin-B1/ CDK1-komplekset [15].

Syklinene dannes og nedbrytes slik at de får sine konsentrasjonstopper tilsvarende de sjekkpunktene de kontrollerer[17]. Aktiverte enzymer kan videre reguleres av inhiberende fosforylering, eller binding av syklinavhengig kinase inhibitor (CKI). *In vivo* er CDK-aktiviteten også avhengig av andre komponenter som for eksempel proteinfamilien kjent som syklinkinase- subenheter (CKS). Samspill mellom proteinkompleksene fører til at cellen kan gå videre til neste sjekkpunkt. Syklinene degraderes ved at de merkes med enzymer kalt ubiquiton som medierer proteolyse av syklinet [18]. Syklinene må nedbrytes for at cellene skal passere M- fasen og deles i to datterceller [19].

TP53 er et tumorsuppressorgen som koder for proteinet tumorprotein TP53, og spiller en viktig rolle i signalveien til G₁- arrest [15]. Proteinnivået øker før aktivering, og aktivert TP53 øker syntesen av syklinavhengig kinaseinhibitor-1A (CDKN1A). Dette forhindrer cellen fra å gå videre til neste sjekkpunkt, og progresjon fra G₁- til S-fase, ved at blant annet RB1 fosforyleres og dermed aktiveres. *RB1* er et annet tumorsuppressorgen som koder for RB1-proteinet. Dersom cellen ikke reparerer feil som for eksempel DNA-trådbrudd vil TP53 få cellen til å gå i apoptose.

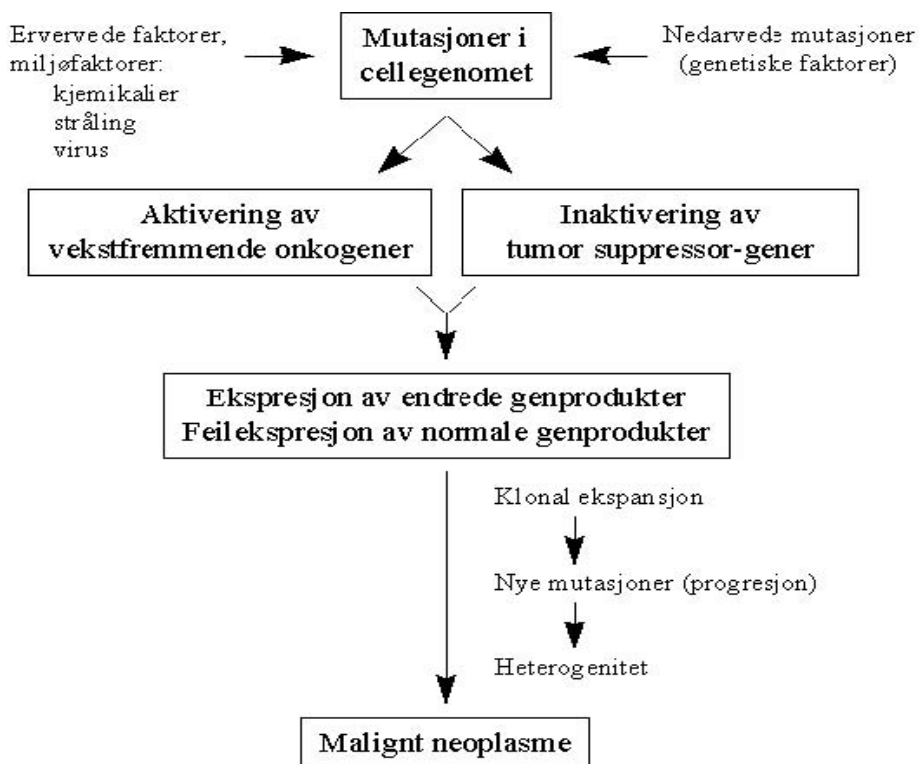
CKS2 antas å være involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase [7]. G₂-arrest forekommer etter oppregulering av syklin-A, men før oppregulering av syklin-B1, slik at celler der et eller flere kromosomer er ødelagt ikke gjennomgår mitosen før de er reparert [16]. Det er ukjent hvilke gener som kontrollerer dette sjekkpunktet, men det antas at *Ataxia telangiectasia mutated (ATM)* kan være en mulig deltaker ved dette sjekkpunktet. I HeLa-celler bidrar ikke genaktivering signifikant til initiering av G₂-arrest som følge av DNA-ødeleggelse [20]. En av funksjonene til TP53 i G₂-/M- fase, er å mediere nedregulering av syklin-B1 og ødeleggelse av syklin-B1/CDK1- komplekset via indusering av andre proteiner [21]. I en nyere studie er det vist at TP53 undertrykte *CKS2* ved at *CKS2*-mRNA ble nedregulert [22]. Tidligere studier har vist at selv om HeLa-celler har ett funksjonelt *TP53*-gen er proteinet mål for det virale E6-proteinet som human papillomavirus uttrykker [20]. *CKS2* burde dermed ikke kunne undertrykkes av TP53 i HeLa, selv om TP53 som ikke er degradert av E6-proteinet antakeligvis fremdeles kan induseres. Det ble i den nevnte studien også vist at plasmidinkorporert TP53 nedregulerte transkripsjon av *CKS2*-promotoren i HeLa-celler [22].

Syklin-B1/CDK1- komplekset fører cellene til mitosen. Dermed avhenger G₂-arresten av at aktivering av dette komplekset hemmes. Cellesyklussjekkpunkt kinasene, CHEK1 og CHEK2 induserer fosforyling av celledelingssyklus 25 homolog C-proteinet (CDC25C) når DNA ødelegges. Dette forhindrer defosforyling og aktivering av syklin-B1/CDK1- komplekset. I kreftceller er ofte et eller flere av sjekkpunktgenene involvert i cellesyklus defekte [12].

1.3 Kreftutvikling og livmorhalskreft

1.3.1 Kreftutvikling

I friskt vev er det en fin balanse mellom celledeling og celledød [23]. Det er ved sjekkpunktene blir det avgjort om cellene skal gå videre gjennom cellesyklus eller ikke. Mutasjoner eller andre arvelige DNA-forandringer i utgangscellen kan utvikles til kreft. Gener som har med vekst, differensiering og eventuelt apoptosemekanismene å gjøre rammes. Forandringene i cellen kan skyldes ioniserende stråling, virus, bakterier eller mutagene kjemikalier som vist i figur 1.3-1.



Figur 1.3-1. Flere ulike faktorer kan spille inn ved krefutviklingen, både arvelige faktorer og miljøfaktorer [23].

En rekke mutasjoner i samspill med andre faktorer er nødvendig for utviklingen av kreft. Forekomsten av kreft øker normalt med alder siden det tar mange år å akkumulere endringer og mutasjoner før en frisk celle utvikles til kreftceller. Et unntak er akutt leukemi som kun forekommer hos barn.

Onkogener er gener involvert i utviklingen av kreft. Når onkogener introduseres av et virus kalles det et viralt onkogen, et eksempel er HPV-gener som detekteres hos mer enn 99, % av pasientene med livmorhalskreft [24]. Onkogener utvikles ved mutasjoner av regulatoriske gener, protoonkogener som finnes i friske celler [23]. Onkogenkodede proteiner kan fungere uavhengig av signalisering. Det vil si at cellene kan vokse ukontrollert, fordi protoonkogenene typisk koder for vekstfaktorer eller ledd i signalveien fra vekstfaktorreseptorer inn til replikasjonsmaskineriet. Ukontrollert celledeling ved kreft kan gi avvik i DNA-mengden i kjernen[25]. Mutasjoner fører også til at totalt DNA-innhold også kalt ploiditet endrer seg. Avvikene kan være brudd, tap, eller feil i kopieringen av kromosomer, og kan måles ved å registrere den totale DNA-mengden i tumorkjernene. DNA-innhold kan måles ved bruk av flowcytometri [26]. Tumorsuppressorgener som *TP53* og *RBI* er recessive i motsetning til onkogener [16]. Det vil si at begge genene i kromosomparet må miste sin funksjon for at proteinene ikke skal uttrykkes. Mens onkogener som tilegner seg en funksjon, bare trenger et av genene i kromosomparet for å aktiveres. *TP53* mister ofte sin funksjon som et steg i kreftutviklingen, noe som forsterker den ukontrollerte celleveksten.

1.3.2 Human papillomavirus i utviklingen av livmorhalskreft

Human papilloma virus-/ HPV-infeksjon er et tidlig trinn i utviklingen av livmorhalskreft[24]. Viruset er epiteliotropt og må formere seg i cellekjernen i epitelceller i hud og slimhinner. HPV-16 og HPV-18 ble i 1995 klassifisert som humane karsinogener. E5-, E6-, og E7- genene fungerer som onkogener og koder for vekststimulerende proteiner. Av spesiell betydning er E6- og E7- proteinene uttrykt av høyrisikotyper av viruset som binder seg til og nedbryter genprodukter fra *TP53* og *RBI*.

HPV-infeksjon er veldig vanlig hos unge kvinner, men kun en minoritet av disse utvikler livmorhalskreft [27]. Det eksisterer mange HPV-typer, og typene assosiert med livmorhalskreft, har ulik evne til å transformere livmorhalsepitelet [28]. HPV-infeksjon alene er ikke nok for malign transformasjon av epitelceller i livmoren. Andre genetiske faktorer er nødvendige i samspill med, og noen ganger uavhengig av HPV.

HPV- 6 og -11 er lavrisiko HPV-typer, gir CIN I og utvikles sjeldent til invasiv kreft[28]. Høyrisiko typene HPV-16,-18,-31,-33 og -35 sees ofte i moderate til alvorlige

vekstforstyrrelser i livmorhals, og detekteres i majoriteten av pasienter med livmorhalskarsinomer. HPV-16 og -18 gir CIN II og III, og har potensialet til å utvikle seg til en invasiv kreftform. Genomet hos viruset i en invasiv kreftform er integrert i pasientens DNA, noe den ikke er i CIN. Hos pasienter der HPV ikke detekteres er TP53 inaktivert av en eller flere mutasjoner.

1.3.3 Epidemiologi og behandling av livmorhalskreft

Livmorhalskreft er den nest hyppigst forekommende kreftformen blant kvinner i U- land [24]. Stadig færre får diagnosen i vestlige land hvor kvinner tar rutinemessige celleprøver av livmoren hos legen. Platteepitelkarsinom er den vanligste svulstformen. 75 % av pasientene får denne svulstformen, mens omlag 25 % av dem får adenokarsinom [29].

Langtidsoverlevelse for pasienter med kreft i tidlig fase er 85 %, mens pasienter med invasiv kreft har en overlevelseshastighet på 31 % [30]. Sykdommen har høyest innsidens hos kvinner i 50-60 års alderen. Intraepitele neoplastiske lesjoner (CIN) er et tidlig symptom på en invasiv kreftform og oppstår i høy grad hos yngre kvinner. CIN karakteriseres av endringer i livmorhalsepitel og viser en varierende grad av uvanlig modning. CIN er forstadiet til livmorhalskreft og deles i tre stadier avhengig av graden av forandringer av cellene i slimhinnen i livmorhalsen [31]. Risikofaktorer er samleie ved tidlig alder, flere partnere, mannlige partnere som selv har hatt mange partnere, samt røyking [32].

Behandlingen avhenger av kreftens stadium som er basert på kliniske kriterier [28].

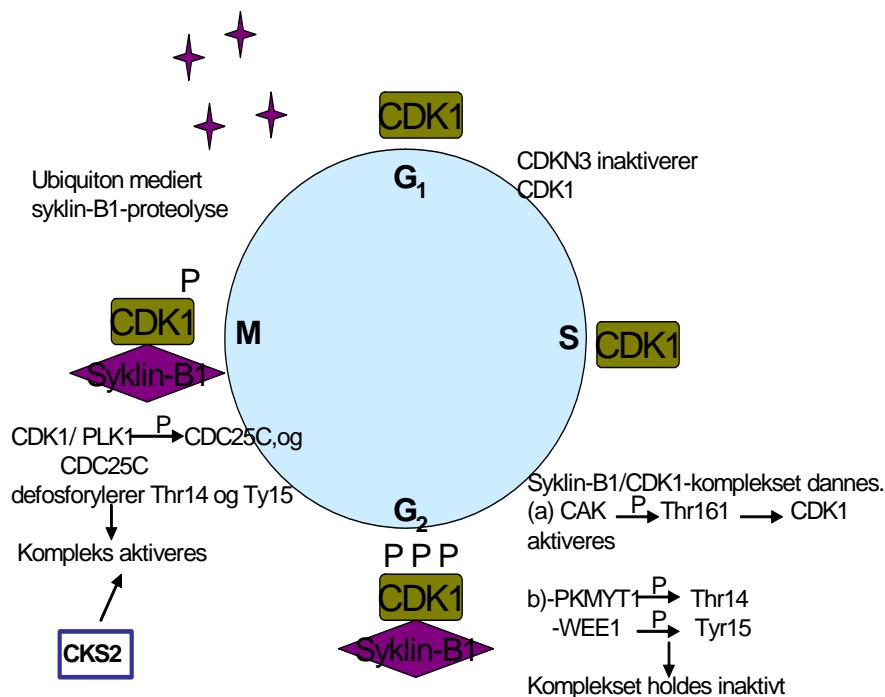
Pasienter med livmorhalskreft stadium IA har en eller flere mikroinvasive tumorer. Disse gjennomgår vanligvis en hysterektomi, som involverer fjerning av livmor og livmorhalsen. Pasienter med livmorhalskreft stadium IB eller IIA behandles med kirurgi eller stråling som gir ekvivalente resultater. Pasienter som har nådd stadiene IIB, III eller IVA behandles med stråling med overlevelseshastighet på henholdsvis 65 %, 40 % og under 20 % [28]. Pasienter som har nådd det siste stadiet, IVB kan også ha godt av stråling, men på dette stadiet er metastasen så utbredt at kreften ikke lenger er kurerbar.

1.4 CKS2

1.4.1 CKS2 i samspill med andre proteiner i cellyklus

CKS er forkortelsen for CDC28-syklinavhengig kinaseregulatorisk subenhet [33]. CKS-proteinene CKS1 og CKS2 er essensielle komponenter av CDK som regulerer mitosene i alle eukaryoter [34]. Studier indikerer at CKS1 er involvert i kontrollen av overgangene mellom G₁- og S-fase, og at både CKS1 og CKS2 er involvert i G₂-/M- overgangen [35-37]. Studier har vist at CKS-proteinene kan bindes til den mitotiske CDK i *saccharomyces cerevisiae* [38], mennesker [39] og froskeegg [36]. CKS1 og CKS2 antas å kunne spille en rolle i celleviabilitet, morfogenese, og celleproliferasjon [34]. Krystallstrukturanalyser bekreftet at CKS2-proteinet kunne bindes til seks CDK1 i et modellsystem [40]. CKS2 var i den nevnte studien formet som en heksamer bestående av to symmetriske dimere. Det ble vist at CKS2 var i stand til å oligomerisere CDK. Dette funnet tyder på at CKS2 kan ha sin funksjon i cellyklus som et sentrum for CDK oligomerisering. CDK1 oligomerisering antas å være et kritisk steg for kinasens biologiske funksjon. Analysen viste også at CKS2 muligens kan ha en evne til å endre konformasjon, og at proteinets strukturelle status kan påvirke tilgjengeligheten av CKS2.

CDK1 og syklin-B1 danner et kompleks i overgangen mellom S- og G₂- fase som vist i figur 1.4-1. Komplekset kalles for mitosepromoterende faktor (MPF) [21]. MPF aktiveres ved fosforylering i threonin161-setet (Thr161), og fjerning av hemmende fosfatgrupper fra threonin14-setet (Thr14) og tyrosin15-setet (Tyr15). Syklinaktiverende kinase (CAK) fosforylerer Thr161 og aktiverer CDK1 i S-/G₂-overgangen. Men selve komplekset holdes inaktivt av proteinkinase membranassosiert tyrosin og threonin-1 (PKMYT1) og WEE1 tyrosin kinase (WEE1), via fosforylering av Thr14 og Tyr15 til G₂-/M-faseovergangen, som vist i figur 1.4-1.



Figur 1.4 - 1 Samspillet mellom en rekke proteiner inkludert CKS2 er med på å føre cellen gjennom cellyklus. Det er vist at CKS2 proteinet er involvert i G₂/M- fase overgangen, og at proteinet kan bindes til CDK1.

CDC25C har en sentral rolle i overgangen mellom G₂-og M-fase, ved at fosfatase defosforylerer Thr14 og Tyr15, og aktiverer syklin-B1/CDK1-komplekset [41]. CDK1 er i stand til å fosforylere og aktivere CDC25C, dette indikerer at det eksisterer en positiv feedback-bue mellom disse to proteinene. Men CDC25C kan også aktiveres av den pololignende kinase-1 (PLK1) som fosforylerer CDC25C. Syklin-B1 degraderes i M- til G₁-faseovergangen, via ubiquitin-mediert proteolyse [18]. Alle sykliner merkes med ubiquiton for å gjenkjennes av proteasomet, som er et proteinkompleks som har som funksjon å nedbryte proteiner. Mitotiske sykliner merkes av APC [42]. Det antas at CKS1 kan spille en rolle i denne degraderingen og at de deretter fjernes fra komplekset [43]. I normale celler der komplekser ikke nedbrytes grunnet mutasjoner i syklinet, arresteres cellen i M- fase [18]. CDK1 inaktiveres av syklinavhengig kinaseinhibitor-3 (CDKN3) i overgangen mellom M- og G₁-fase [44].

Det er vist at CKS (homologer) muligens er involvert i moduleringen av tyrosinfosforylering av syklin-B1/CDK1-komplekset [6]. CKS1 (homolog) er også vist å kunne være involvert i

nedbrytingen av syklin-B1/CDK1-komplekset i M-fase. I fravær av CKS1 ble syklin-B1 arrestert i M-fase fordi ingen proteolytisk degradering via det anafasepromoterende komplekset (APC) forekom [43].

1.4.2 CKS2 funksjon

CKS2 er vist å kunne være forbundet med proliferasjon i både normalvev, og maligne lymfoid tumorceller hos mennesker[45]. *CKS2*-mRNA økte fra G₁- til M-fase, og *in vitro* var de fosforylerte formene av CDK1 og CDK2 koblet til CKS i denne studien. Det uttryktes signifikant mer av *CKS1* og *CKS2* i akutt lymfoid leukemi T- celler enn i de andre tumorcellene og de friske cellene. Immunopresipitering av Reh6-celler viste at CKS1 og CKS2 var lokalisert i kjernen og ikke i cytoplasma. Det ble i en annen studie vist at CKS1 (homolog) var lokalisert i kjerneområdet i interfase og profase [46]. Men når kjernemembranen ble oppløst i prometafase ble proteinet ekstrahert ut til cytoplasma. Dette gir en indikasjon på lokalisasjonen av proteinet i planteceller.

Forskere har en studie avlet fram knock-out mus der *CKS2*-genet var slått ut [47]. Histologisk så vev fra hann *CKS2*⁻-mus likt ut som vanlig vev, bortsett fra atrofi i testiklene. I *CKS2*⁺-mus ble alle faser i spermatogenesis observert, mens i *CKS2*⁻-musen ble en metafase I-arrest detektert, og få eller ingen anafaser ble dermed observert. Dessuten var syklin-B1nivået høyere i motsetning til andre proteiner involvert i cellyklus. Dette funnet var i tråd med en metafase I-arrest, der syklin-B1 vil akkumuleres og ikke degraderes via APC. Den observerte steriliteten hos hann *CKS2*⁻-musene så ut til å være en konsekvens av metafase I-arresten i oocytter (eggceller). Metafase-I-arrest i spermatocytter og eggceller ble sannsynligvis forårsaket av manglende evne til å inntre anafase og ikke på grunn av sjekkpunktmediert metafase-I-arrest. Konklusjonen til forskerne var at *CKS2* kunne fungere som et kritisk bånd mellom proteinene som er involverte i meiotisk (kjønnsdeling) kromosomrekombinasjon, og kromosomsegregering i mus.

2. Metodisk bakgrunn

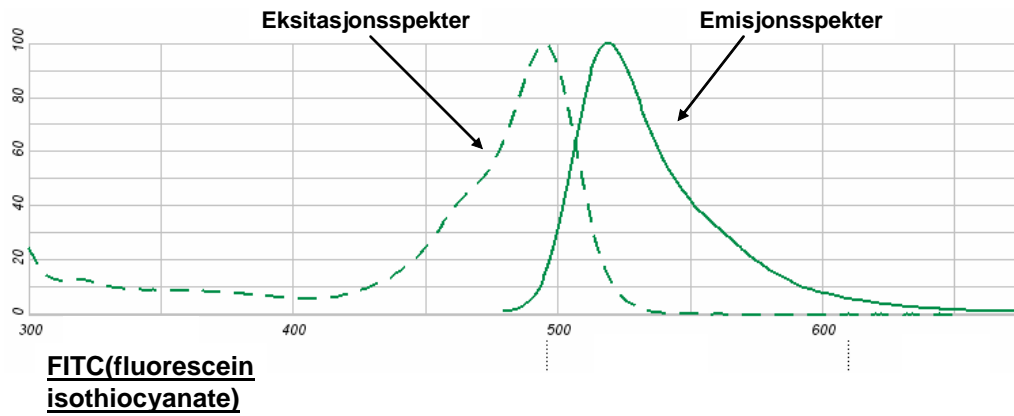
2.1.1 Celledyrking av adherente celler

Noen celletyper kan dyrkes i kultur på laboratoriet og det er ofte ønskelig at cellene skal vokse i det uendelige[48]. Kreftceller har vanligvis en ukontrollert cellevekst grunnet aktivering av onkogener, og/eller fordi tumorsupressorgener er defekte. Friske celler har ikke denne egenskapen som kreftceller har.

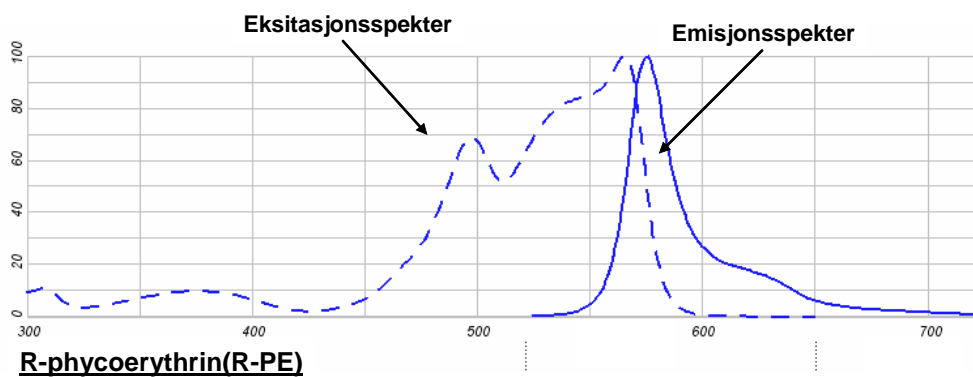
Cellens vekst er avhengig av at temperatur, pH og medium som anvendes er tilpasset den spesifikke cellelinjen. Celler i cellekulturen vil gjennomgå tre vekstfaser. Den første tiden vokser ikke cellene, derfor kalles dette for en lag-fase. Cellene trenger tid til å tilpasse seg det nye miljøet fra fryser (-80°C) til medium (37°C). Denne tiden varierer fra cellelinje til cellelinje. Når de tilvenner seg det nye miljøet, før de vokser optimalt vil cytoskjelettet i cellene endre seg slik at cellene kan festes til celledyrkingsflaskene. Lag-fasen følges av en log-fase der cellene vokser eksponensielt. Den siste fasen kalles platåfasen der celletallet er konstant, og dyrkingsarealet blir konfluent, det vil si at cellene trenger mer plass og må splittes til flere flasker for å kunne fortsette å vokse.

2.2 Fluorescens

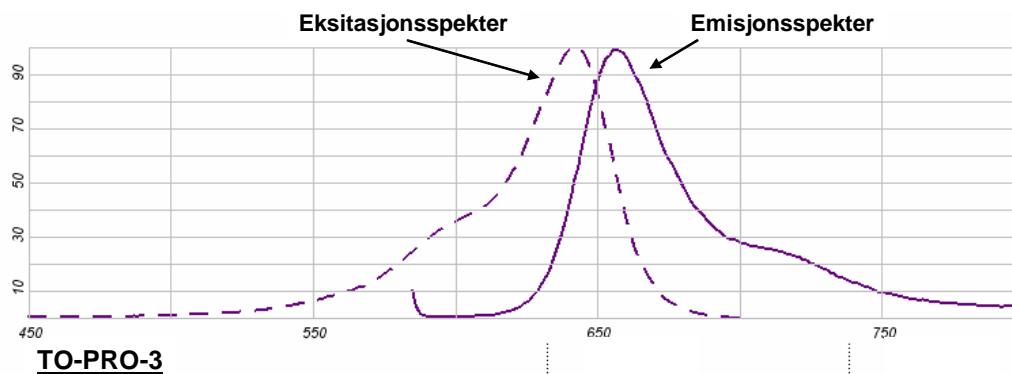
En fluorescerende forbindelse, også kalt et fluorokrom, absorberer energi i form av lys i et bølgelengdeområde som er karakteristisk for fluorokromet [49]. Under denne prosessen eksiteres et elektron til en høyere energitilstand og sies å være eksitert. Det eksiterte elektronet er i en ustabil energitilstand og vil dermed raskt gå tilbake til sin opprinnelige energitilstand. Overskuddet energi emitteres, det vil si avgis i form av et foton, og det er denne emisjonen av energi som kalles fluorescens. Fluorokromet eksiteres ved bestemte bølgelengder kalt fluorokromets absorpsjonsspekter, mens bølgelengdeområdet for det emitterte lyset kalles fluorokromets emisjonsspekter. Emisjon skjer ved en høyere bølgelengde enn eksitasjon. Spektrene for fluorokromene anvendt i denne oppgaven er vist i figurene 2.2-1-2.2-4.



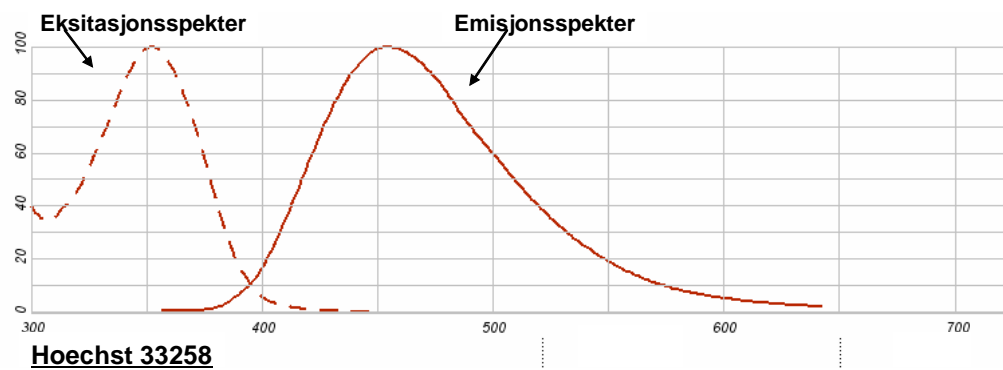
Figur 2.2-1. Fluorokromet, fluoresceinisothiocyante (FITC), som ble brukt for å farge CKS2-proteinet, har sin eksitasjonstopp ved 495nm og sin emisjonstopp ved 517 nm. Revidert fra [50]



Figur 2.2-2. Fluorokromet, R-phycoerythrin (R-PE), som ble brukt for å farge M-fase cellene, har sin eksitasjonstopp ved 550nm og sin emisjonstopp ved 590nm. Revidert fra [50]



Figur 2.2-3. Fluorokromet TO-PRO-3, som ble brukt for å farge DNA i fikserte celler før konfokalmikroskopi, har sin eksitasjonstopp ved 642nm og sin emisjonstopp ved 661nm. Revidert fra [50]

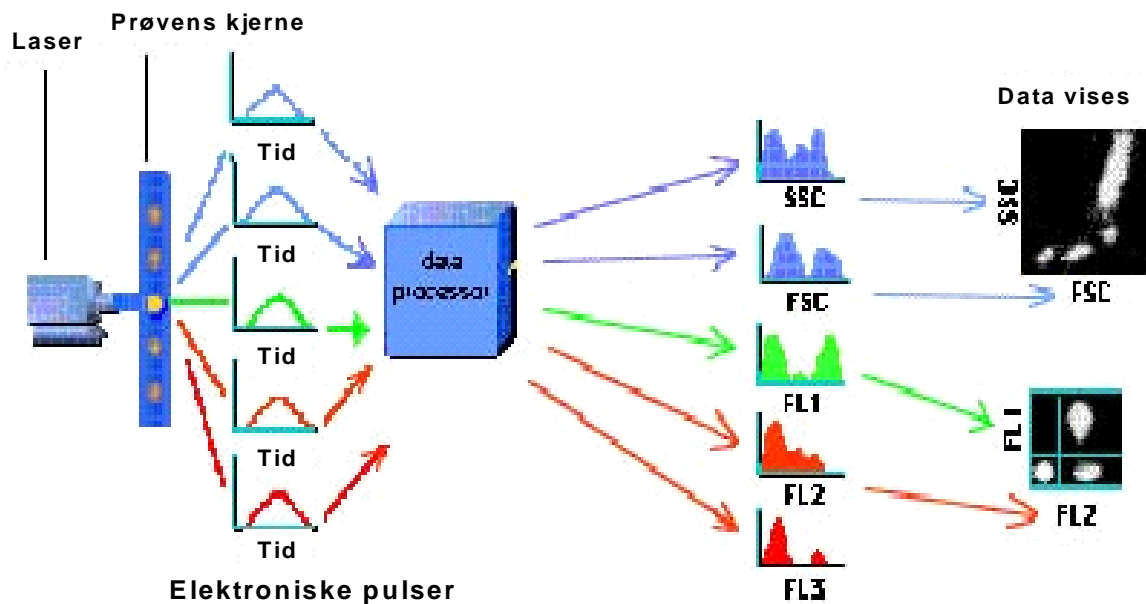


Figur 2.2-4. Fluorokromet, Hoechst 33258, som ble brukt for å farge DNA i fikserte celler, har sin eksitasjonstopp ved 345nm og emisjonstopp ved 455 nm. Revidert fra [50].

2.3 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode brukt til å måle individuelle cellers, eller andre biologiske partiklers fysiske og kjemiske egenskaper i en væskestrøm [26]. Cellene merkes med fluorokromer som bindes til komponenten som ønskes å studere. Når cellene bestråles med en lyskilde som for eksempel en laser avgis fluorescens og spredt lys som detekteres av ulike detektorer. Metoden kan blant annet bli brukt til å måle protein- og DNA-innhold, som i denne oppgaven.

Et flowcytometer består av tre systemer, et væskesystem, et optisk system og et elektronisksystem [49]. Væskesystemet pumper prøven til lyskilden. Det optiske systemet består av lasere og optiske filter som skal dirigere fluorescens og spredt lys til riktig detektor. Signalene detekteres i det væskestrømmen treffer laserstrålen. I denne oppgaven ble ulike lasere anvendt som lyskilder for å detektere CKS2, DNA og kunne skille mitosene fra interfasecellene. Det elektroniske systemet oversetter lyssignalene til elektroniske signaler. Suspenderte partikler eller celler med størrelse 0,2-150 μm i diameter kan anvendes som prøver. Data som senere kan anvendes for analyse av ulike parametere og statistiske utregninger samles og lagres i datamaskinen som vist i figur 2.3-1.



Figur 2.3-1. Laserstrålen treffer prøven som vist i figur. Data om lysspredning og fluorescerende egenskaper samles og lagres på datamaskinen. Data prosessoren omgjør de ulike signalene til histogrammer og plots. Disse kan analyseres og gi informasjon om ønsket subpopulasjon eller cellesubenheter som for eksempel et protein. Revidert fra [49].

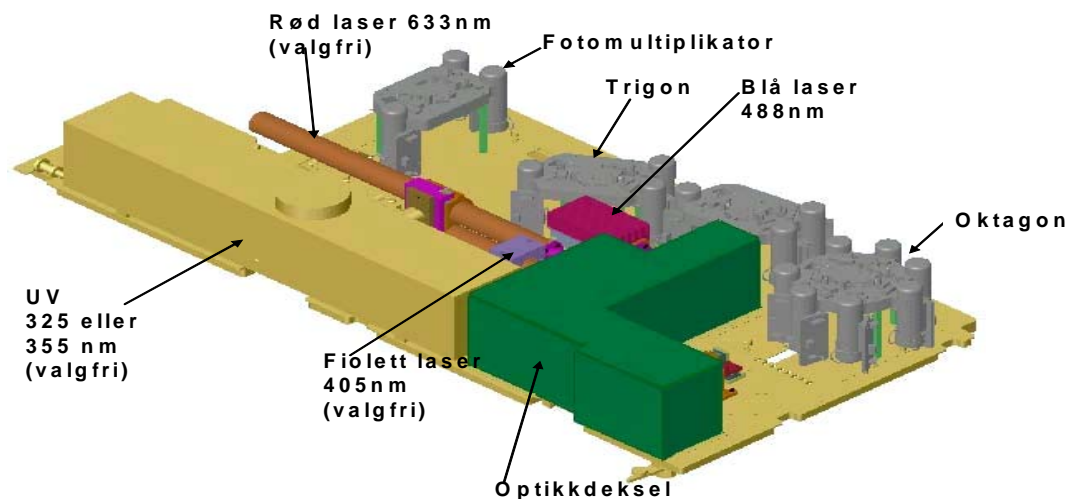
2.3.1 Væskesystemet

For optimal bestråling bør prøven være sentralisert i væskesystemet, og kun en celle eller partikkel bør kunne passere laseren av gangen [49]. Væsken rundt prøven holder prøven i sentrum og driver cellene/ partiklene framover. Denne prosessen kalles hydrodynamisk fokusering. Prøvene har alltid høyere trykk enn væskelagene rundt, og ved å endre prøvens trykk i forhold til væskelagene rundt reguleres flowhastigheten av prøven. Dersom en skal analysere DNA er det nødvendig med et lavt prøvetrykk for å oppnå best mulig oppløsning. Men ved kvantifisering må en ha en lav flowhastighet, slik at væskestrømmen blir tynn nok til at alle cellene passerer laseren hver for seg.

2.3.2 Det optiske systemet

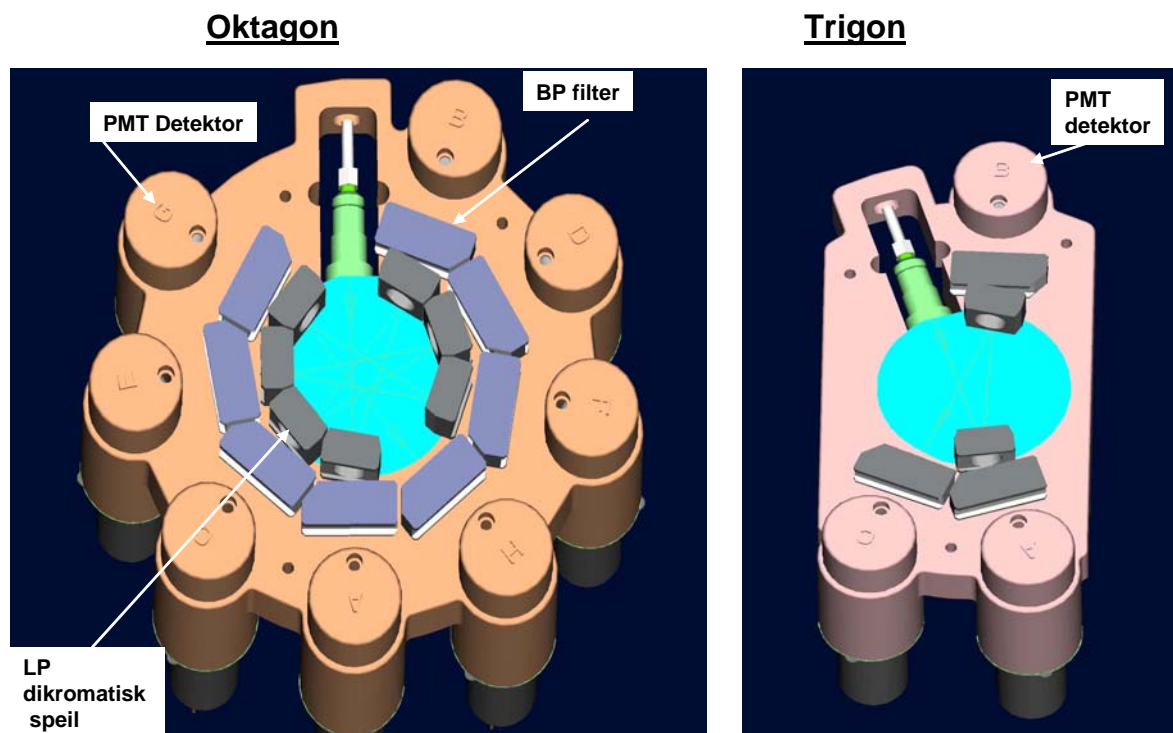
Eksitasjonsoptikken består av lasere og linser som brukes for å forme og fokusere laserstrålen[49]. LSRII-flowcytometeret som ble brukt i denne oppgaven kan brukes med opptil fire lasere [51]. Hovedlaseren som følger med maskinen kalles Coherent Sapphire, den genererer forward scatter- (FSC) og side scatter- signaler (SSC) og opptil fire fluorescenssignaler ved 488nm. UV- laseren som kan suppleres genererer to fluorescenssignaler ved 355 nm. En tredje laser kan generere to fluorescenssignaler ved 405 nm. En fjerde laser kan generere to fluorescenssignaler ved 633 nm.

Oppsamlingsoptikken består av oppsamlingslinser for å samle emittert lys, og et system av optiske speil og filter, for å dirigere samlet lys til rett detektor avhengig av bølgelengde spesifikasjoner[49]. Optiske filter blir brukt for at fluorescensemisjon, men ikke fluorescenseksitasjon skal slippe gjennom til detektorer, på bakgrunn av bølgelengde[26]. Den optiske benken i LSRII-flowcytometeret består av lasere, filter og fotomultiplikatorrør (PMT) som vist i figur 2.3-2.



Figur 2.3-2. Slik ser den optisk benken i LSR- II maskinen ut. Vi ser fire lasere, den blå er en standard laser mens de andre er valgfrie. Vi ser også hvor fotomultiplikatorrørene og hvordan filtrene er plassert i et oktagon og trigon. Revidert fra [49].

I det cellen eller partikkelen passerer laserstrålen vil emittert SSC-signaler og fluorescenssignaler endre retning mot PMT, mens en fotodiode samler FSC-signalene. Et system av speil og optiske filter fører signalene til riktig detektor. Filtrene slipper inn lys i et begrenset bølgelengdeområde. Dette spekterbåndet av lys er nær emisjonstoppen for fluorokromet og kalles bandpass (BP) filter. Filter som transmitterer lys med samme eller kortere bølgelengde enn den spesifiserte kalles shortpass (SP) filter. Filter som transmitterer lys med samme eller lengre bølgelengde enn den spesifiserte kalles longpass (LP). Figur 2.3-3 viser den fastsatte konfigurasjonen av BP og LP i LSR- II maskinen. Navnene oktagon og trigon indikerer tre og åtte detektorer i konfigurasjonen. Denne kan endres avhengig av forsøksoppsett.



Figur 2.3-3. BD LSR II- maskinens standardkonfigurasjon av oktagon og trigon består av dikromatiske langpass speil i den innerste ringen, og båndpass filter på deres ytre ring. De er begge utstyrt med PMT detektorer. Denne konfigurasjonen kan endres. Revidert fra [49].

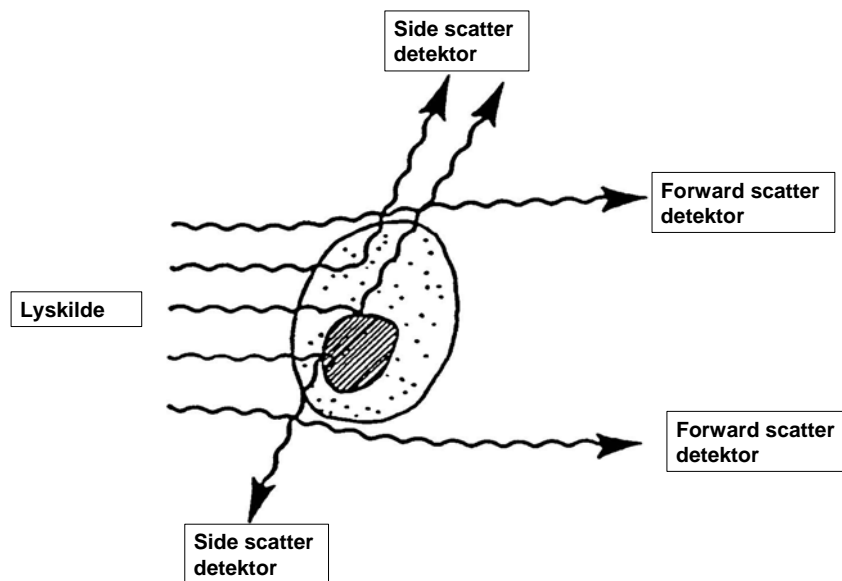
Tabell 2-3-1 viser ulike parametere, lasere og detektorer som er brukt i denne oppgaven på LSRII-maskinen.

Tabell 2.3-1. De ulike parametrene måles i ulike detektorer og eksiteres av enten den blå laser (488nm) eller UV-laseren. FSC detekteres i en fotodiode, mens de andre parametrene detekteres i ulike PMT i oktagonformede detektorsystemet.

Parameter	Laser	Detektor
FSC	488nm (blå laser)	Fotodiode
SSC	488nm(blå laser)	PMT(oktagon)
FITC	488nm(blå laser)	PMT(oktagon)
PE	488nm(blå laser)	PMT(oktagon)
Hoechst	325nm(UV-laser)	PMT(oktagon)

2.3.3 Det elektroniske systemet og signaldeteksjon

Lysspredning oppstår når partikkelen endrer retning i det den passerer det innfallende laserlyset som vist i figur 2.3-4 [49]. Faktorer som cellemembranen, cellekjernen og andre granulære enheter kan virke inn på hvordan lyset spres. FSC korresponderer til celleoverflatens areal eller størrelse, mens SSC korresponderer til cellens granularitet og interne kompleksitet.

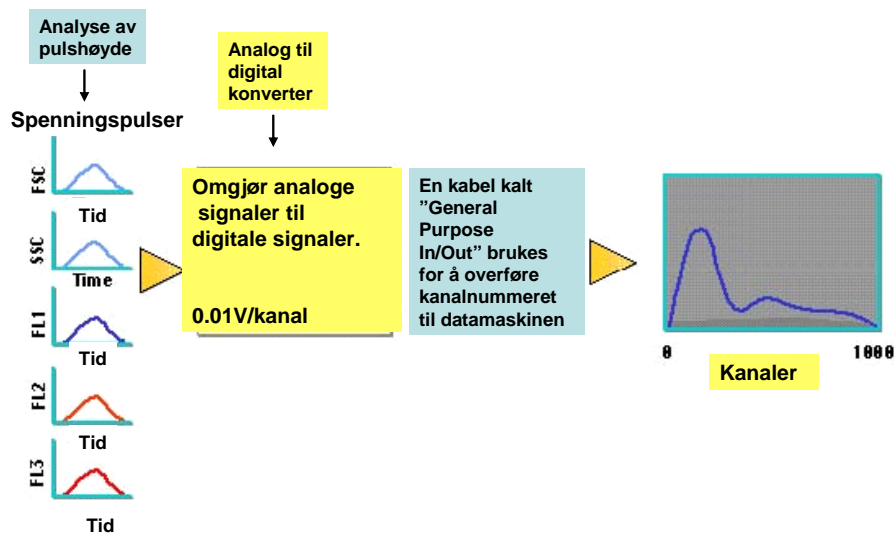


Figur 2.3-4. Lysspredningsegenskaper og andre parametre som cellens granularitet kan detekteres av Forward scatter detektoren og Side scatter detektorene. Revidert fra [49].

SSC-signalene samles i en linse 90° for laseren og dirigeres av en lyssplitt til en passende PMT-detektor. Signalene konverteres til elektroniske signaler av fotodetektorer, fotodioder og PMT. Fotodioder er mindre sensitive og tar opp sterke signaler fra FSC, mens PMT er mer sensitive og tar opp svakere signaler fra SSC og fluorescensen.

Et fluorokrom kan konjugeres på et antistoff, og anvendes til å identifisere celletyper, eller celledelenheter på bakgrunn av antigenet det binder seg til [49]. Fluorescenssignalene kombinert med Forward scatter (FSC) og Side scatter (SSC) data kan anvendes for å identifisere hvilke celler som er til stede i prøven, samt prosentandel av hver populasjon.

Analog til digital konverteren omgjør 0-10 V puls til et digitalt tall. I analoge systemer tillegges spenningspuls en digital verdi som representerer 0-1000 kanaler. Kanalnummeret overføres til datamaskinen og lyssignalet vises da i en passende posisjon på dataplottet som vist i figur 2.3-5.



Figur 2.3-5. Analog til digital konverteren gir spenningspulsen en digitalverdi som representerer et kanalnummer. Kanalnummeret overføres til datamaskinen via "General Purpose In/Out"(GPIO) kabelen. Da vises lyssignalet i en passende posisjon på dataplottet med kanalnumrene. Revidert fra [49].

Det settes en terskelverdi for signalintensiteten til å luke ut bakgrunn eller støy, som for eksempel uspesifikk binding av et antistoff. Det er kun signaler som har samme intensitet eller høyere intensitet enn den satte terskelen som vil prosesseres og sendes til datamaskinen.

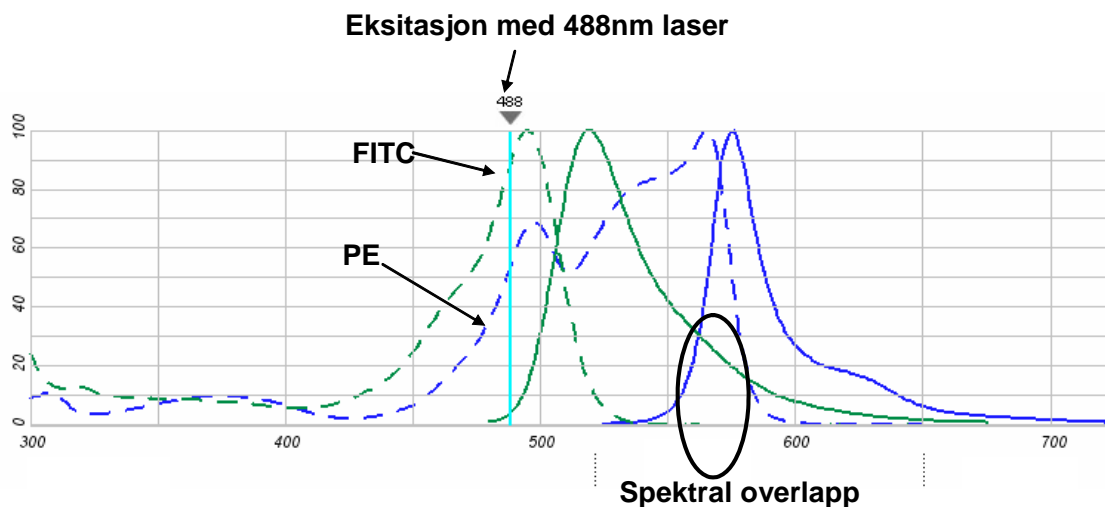
2.3.4 Dataanalyse

En datalagringsfil inkluderer en beskrivelse av prøvene som trengs, datasettet og resultatene fra analysen [49]. En celleanalyse består ofte av 4 parametere (FSC, SSC, FITC, PE). De ulike parametrene kan vises som ulike plott, som for eksempel FITC-siganler detektert versus PE-signaler detektert. En kan for eksempel fremstille toparameter dottplott, der hver prikk representerer en eller flere events.

En gate er et grafisk vindu som kan brukes for å velge ut karakteristika en vil se på. En kan for eksempel skille M- fase fra interfase, ved å gate inn cellene på bakgrunn av fluorokromkonjugerte-antistoffer med spesifitet for mitosene.

2.3.5 Kompensasjon

Fluoresceinisothiocyanate (FITC) og Phycoerythrin (R-PE/ PE), to av fluorokromene anvendt i denne oppgaven, eksiteres begge med 488nm laseren. I flowcytometeret anvendes en laserkilde som kan eksitere flere fluorokromer ved 488nm. Da må fluorokromenes emisjonsbølgelengde ligge langt nok fra hverandre, for at fluorescenssignalene skal kunne detekteres i ulike detektorer. FITC og PE tilfredsstiller dette kriteriet. Men emisjonsspektrene av fluorokromene er sammenfallende som vist i figur 2.3-6 [49].



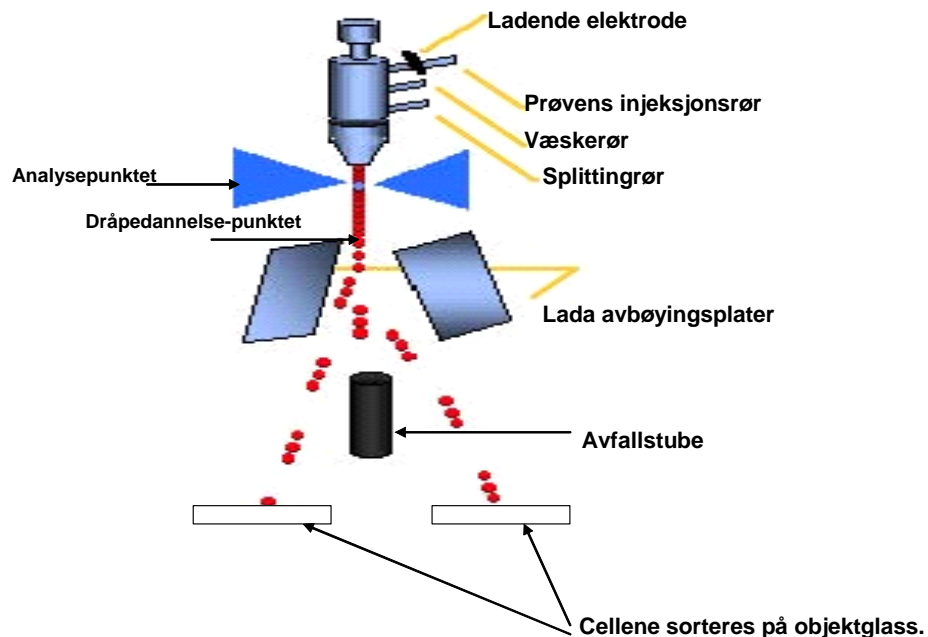
Figur 2.3-6. Spektral overlap mellom FITC (grønn) og PE (blå). Emisjonsspekteret til FITC er 530 ± 30 nm, mens for PE er det 576 ± 26 nm, spektrene vil dermed overlappe. Revidert fra [50].

Dermed kan deres emisjon detekteres i en detektor ment for det andre fluorokromet. Overlappen kan kompenseres for ved å kjøre partikler eller celler farget med de samme fluorokromene i flowcytometeret før forsøket [52]. Korrekt kompensasjon krever at partiklene som anvendes har samme emisjonsspekter som fluorokromene.

2.3.6 Cellesortering

Noen flowcytometere kan også anvendes for å sortere celler i ulike populasjoner[53]. Dermed kan ulike cellepopulasjoner sorteres hver for seg fra en kompleks blanding og så snart cellene er sortert ut kan de benyttes til andre analyser eller de dyrkes videre i kultur.

Både levende og fikserte celler kan sorteres. BD FACS Vantage-SE som ble anvendt i denne oppgaven, er et "stream in air" cytometer som isolerer ønskede cellepopulasjoner ut fra prøven ved at hele prøvestrømmen vibreres ved en bestemt spenning[49]. Basert på deres fluorescens eller lysspredningskarakteristika, bestemmes det hvilken populasjon celler tilhører i analysepunktet som vist i figur 2.3-7 [54].



Figur 2.3-7. Prinsippene for sortering av celler ved flowcytometri. Det ene røret injiserer prøven, det andre fører en væskestrøm, den tredje splitter strålen. Ønskede cellepopulasjoner samles vanligvis i hvert sitt rør. I denne masteroppgaven ble cellene sortert direkte på objektglassene. Celler som ikke har noen ladning og ansees som avfall, samles i avfallsrøret vist i midten i figuren. Revidert fra [49].

Ved en bestemt avstand fra analysepunkt dannes dråper bestående av en celle fra den ønskede cellepopulasjonen. Dråpene gis en ladning på bakgrunn av gatene satt i programvaren før sorteringen [49]. Deretter passerer de ladede dråpene mellom to ladede metallplater, avbøyes og føres ned til røret for rett cellepopulasjon, som vist i figur 2.3-7. Dette kan skje fordi de ladede platene vil avstøte celler med samme polaritet, men tiltrekke celler med motsatt polaritet. Det er mulig å sortere ut opptil fire ulike cellepopulasjoner samtidig. I denne oppgaven ble FACS Vantage-SE flowcytometeret brukt for å sortere fikserte celler i ulike cellesyklusfaser før konfokalmikroskopi.

2.4 Fluorescensmikroskopi og konfokalmikroskopi

2.4.1 Fluorescensmikroskopi

Prinsippet for denne teknikken er at antistoffmolekylene merkes med egnede fluorokromer som gir fluorescens ved bestråling med en kvikksølvlampe [55]. Subenheter i celler og deres funksjoner kan studeres både kvantitativt og kvalitativt ved å preparere cellene med fluorokromkonjugerte antistoffer. Fluorokromene er spesifikke for ulike bestanddeler som for eksempel proteiner, RNA eller DNA. Fluorescenssignalet som detekteres kan blant annet avhenge av miljøets temperatur, pH, Ca-ioner og nærvær av andre fluorokromer.

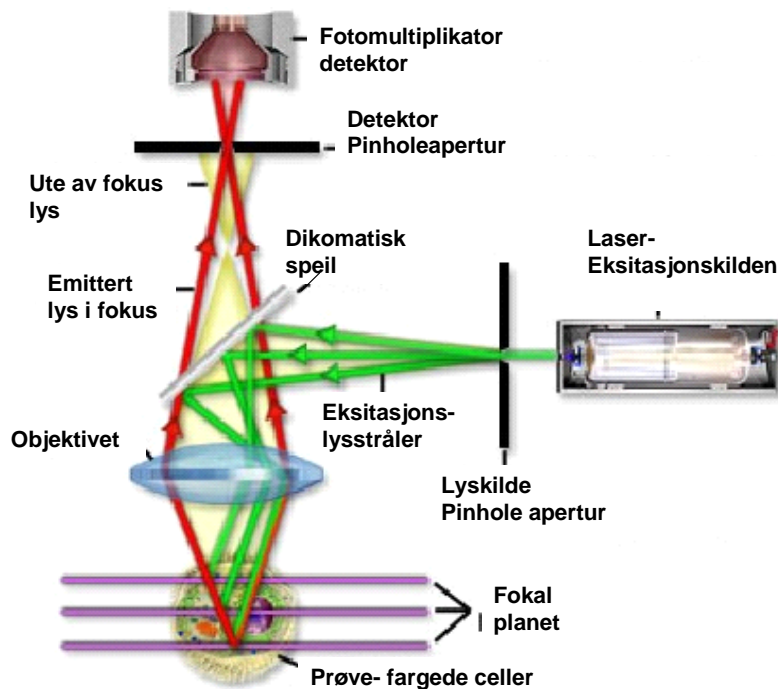
2.4.2 Konfokal laserskanning mikroskopi (KLSM)

En ulempe med fluorescensmikroskopi er bidraget fra lys over og under planet som avbildes, dette reduserer blant annet dybdeskarpheten av bildet [56]. Dette problemet kan løses ved å bruke et konfokalt mikroskop. Ulike dybder og snitt av celleprøven kan avbildes, og konfokalmikroskopet kan brukes til å visualisere cellekjernen uten fluorescensbidraget som avgis fra cytoplasma. Det er i motsetning til i et konvensjonelt fluorescensmikroskop mulig å skille proteiner lokalisert i kjerneområdet og proteinet som er lokalisert på celleoverflaten. Konfokalmikroskopi egnet deg derfor til bruk i denne oppgaven, der det var viktig og kunne skille CKS2 som var lokalisert i kjerneområdet fra det som var lokalisert utenfor. Antall optiske snitt kan defineres og studeres hver for seg, eller sammenlagt som en ”stack” av alle snittene.

Konfokalmikroskopi kan også anvendes til å skape 3D-bilder og studere spesifikke celleulære reksjoner over en lengre periode. KLSM anvendt i denne oppgaven hadde også en interferenskontrastfunksjon som kunne anvendes til å studere cellekonturen.

Konfokalmikroskopet har dessuten flere detektorer, og kan detektere ulike fluorescenssignaler i ulike kanaler (jamført kanalnumrene i flowcytometeret) samtidig.

Kombinering av to eller flere fluorescensbilder som er gitt forskjellige farger, kan gi detaljert informasjon om lokalisasjonen av for eksempel et protein. Dette er benyttet i denne oppgaven for å studere CKS2 lokalisert i forhold till cellens kjerneområde/DNA. En liten åpning kalt pinhole brukes for å fjerne lys over og under prøven i et konfokalt laserskanning mikroskop (KLSM) som vist i figur 2.4-1 [57].



Figur 2.4-1. Oppbygning av et KLSM. En fluorescerende celleprøve belyses av en laserstråle fra pinhole-aperturen til fokuspunktet. Det meste av emittert lys utenfor fokuspunktet detekteres ikke av fotomultiplikatordetektoren. Revidert fra [58].

Laserstrålen fokuseres først til pinhole i apparatet for deretter å reflekteres til prøvens fokusplan [11]. Fluorescens som emitteres fra celleprøven skal gjennom pinhole og til detektoren. Pinhole plasseres slik at emittert fluorescens fra fokuspunktet går gjennom og detekteres. Det meste av fluorescensen som er utenforliggende fokusplanet ekskluderes. Emittert fluorescens separeres fra eksitasjonslys ved bruk av dikromatiske speil og barrierefilteret. PMT detekterer lyset i KLSM. Disse sitter over pinhole i konfokalmikroskopet som vist på figur 2.4-1.

Celler konjugert med et eller flere fluorokromer belyses med en fokusert laserstråle og eksiteres i konfokalmikroskopet. Det vanligste er at mikroskopet er utstyrt med en argon-kryptonlaser [59]. Argonlaser alene dekker UV- lys, det gjør ikke kombinasjonslaseren argon-kryptonlaser. Denne kombinasjonslaseren dekker bølgelengdene 488nm, 568nm og 647nm. Argon- kryptonlaseren kombineres ofte med en helium- neonlaser som dekker grønn- til rød- fluorescens ved bølgelengdene 543nm, 594nm, 612nm og 633nm. KLSM som ble brukt i denne oppgaven var utstyrt med en argon-kryptonlaser og en helium- neonlaser. FITC ble eksitert med argon-kryptonlaseren ved 488nm, mens TO-PRO-3 ble eksitert med helium-neonlaseren ved 633nm.

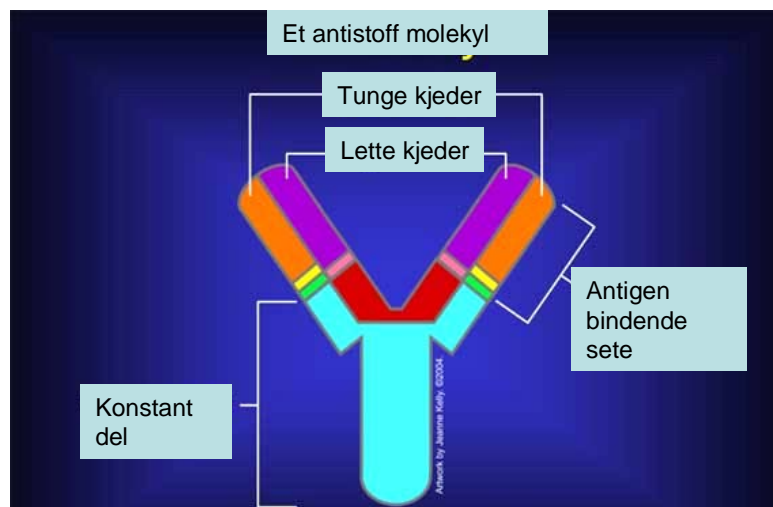
Konfokal laserskanning mikroskopi har imidlertid også en rekke ulemper. For det første belyses hele det konfokale planet på en gang, noe som fører til raskere blekning og degradering av prøven. For det andre blir fluorescenssignalet påvirket av lysspredning utenfor fokalplanet, dette gjelder spesielt prøver der fluorokromer med lange eksitasjonsbølgelengder er anvendt. Dessuten er metodens følsomhet lineært avhengig av laserens intensitet, noe som gjør det vanskelig å avbilde fluorescerende molekyler som finnes i meget lave konsentrasjoner.

Cellulære komponenter detektert ved mikroskopering i denne oppgaven er proteinet CKS2 som er farget med FITC, DNA farget med TO-PRO-3. Celler sortert før mikroskopering er i tillegg farget med Hoechst 33258 for DNA, og PE for å skille mitosene fra G2-fase. Hoechst 33258 eksiteres med UV- lys. Fluorokromet passet dermed ikke til deteksjon av DNA i KLSM anvendt i denne masteroppgaven, siden laserne ikke eksiterer lys ved UV-lysets bølgelengder.

2.5 Antistoffbinding

Antistoffer er proteiner som produseres av B-celler når et fremmed protein, eller polysakkarid kalt et antigen oppdages av immunsystemet i organismen [11]. Antistoffer beskytter organismen mot infeksjoner, ved å bindes til og merke antigenene, som ofte befinner seg på overflaten av virus og bakterier for destruksjon. Ulike antigener har ikke den samme oppbygningen, dette fører til dannelsen av et antistoff med spesifikke antigenbindende-seter. Antigenet bindes til dette setet på antistoffet. Antistoffet vil ha høyest

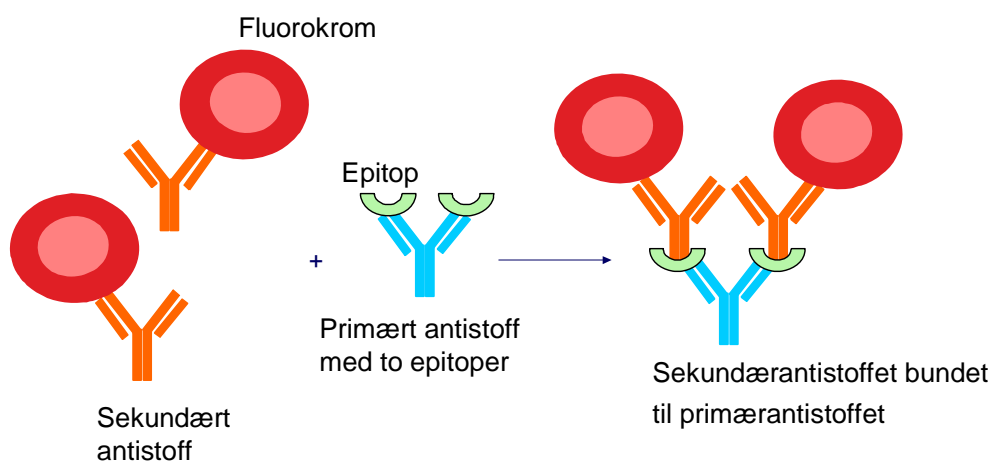
affinitet til sitt spesifikke antigen, selv om det kan bindes til lignende antigener og gi en uspesifikk binding. Ved flowcytometri kan antistoffert konjugert med et fluorokrom brukes for deteksjon av blant annet DNA og ulike proteiner. Fluorescenssignalet fra den uspesifikke bindingen kan her trekkes fra signalet fra totalsummen av antistoff- antigenbinding. Antistoffer er Y formet som vist i figur 2.5-1 og består av aminosyrekjeder kalt tunge kjeder nederst som angir deres funksjon, og lette kjeder øverst som innehar de antigenbindende setene.



Figur 2.5-1. Et antistoff består av to identiske lette kjeder og to identiske tunge kjeder og er formet som en Y. Den øverste delen er variabel og formet etter antigenet det binder, mens stammen er lik for hver klasse. Revidert fra [60]

Antistoffene kan være monovalente, bivalente eller polyvalente det vil si bestå av ett (monovalent) eller flere antistoffmolekyler. Antistoffer kan produseres ved å injisere et antigen i et dyr. Dyret som for eksempel kan være mus eller geit, vil da produsere antistoffer mot antigenet. Et antiserum som inneholder en blanding av ulike antistoffer som gjenkjenner deler av antigenet dannes. Det vil si at det ikke produseres et spesifikt immunoglobulin. Dette kalles polyklonale antistoffer. Polyklonale antistoffer er til forskjell fra de monoklonale antistoffene en blanding av flere ulike antistoffer. Monoklonale antistoffer kan produseres med hybridomaceller. Dette er en fusjonering av kreftceller fra mennesker og muse B-celler fra en mus som er immunisert med et antigen [60]. De fusjonerte cellene kalles hybridceller. Deretter tilsettes et selektivt medium hvor kun hybridcellene overlever.

Vev fra andre organismer vil detekteres som antigener, og det fremmede vevet vil oppfatte vertens antistoffer som noe fremmed og danne antistoffer mot dette. Disse antistoffene kalles for sekundære antistoffer, og antistoffene som opprinnelig var i verten kalles for primærantistoffer. Denne reaksjonen kan utnyttes for å forsterke fargereaksjonen anvendt for å preparere cellene til flowcytometri- eller konfokalmikroskopi-forsøk. Antall epitoper på antigenets overflate bestemmer antall antistoffer som bindes. Dersom det primære antistoffet har flere epitoper kan den binde opptil flere antistoffer som er konjugert med fluorescerende fargestoffer, som vist i figur 2.5-2. Dette forsterker fluorescenssignalene, slik at de lettere kan detekteres i for eksempel flowcytometeret eller konfokalmikroskopet.



Figur 2.5-2 Et primært antistoff binder seg til et sekundært antistoff. Dette forsterker antistoffbindingen og fargingen.Revidert fra [61].

Mus anti- CKS2 og Kanin anti- PH3 ble anvendt som primærantistoffer, og FITC-konjugert geit anti- mus og PE-konjugert geit anti- kanin som sekundærantistoffer i denne masteroppgaven var

3. Materialer og metoder

3.1 Cellelinjer

3.1.1 HeLa cellelinjen

Hela er den første cellelinjen fra mennesket som på en suksessfull måte kunne vokse i en cellekultur. Kilden for cellelinjen er en adenokarsinom hos en kvinne med livmorhalskreft. Cellene inneholder HPV-18, intakt RB1-funksjon og TP53-proteinuttrykk er lavt[61].

3.1.2 SiHa cellelinjen

Cellelinjen stammer fra et plateepitelkarsinom i livmorhalsen [62]. SiHa-celler er infiserte med HPV-16 og har tumorsuppressorgenene *TP53* og *RB1* intakt.

3.2 Høsting og telling av celler

3.2.1 Celledyrking

Cellene ble dyrket som beskrevet i vedlegg 1. Cellene ble inkubert i en CO₂ inkubator ved 37 °C. Konsentrasjonen av CO₂ er 5 % noe som gir en pH på 7,2. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tilsatt kalveserum ble anvendt, og medium ble skiftet 2-3 ganger i uken. Cellene ble inkubert i T75- flasker. Begge cellelinjene er adherente celler som under inkubasjonen festet seg til bunnen av flasken.

3.2.2 Splitting av celler

Cellene ble tatt ut av inkubatoren og studert i mikroskopet, deretter splittet som beskrevet i vedlegg 2. Medium ble sugd av og rester av medium vasket bort med PBS. Cellene ble tilsatt trypsin for at de skulle løsne fra flasken. Trypsinet skulle dekke hele overflaten. Cellene ble inkubert med trypsinet i 5 minutter for å påskynde prosessen. Cellene skulle ikke bli stående

i inkubatoren lengre enn 5-10 minutter, siden dette kunne ført til at cellene klumpet seg sammen. Cellene ble tatt ut av inkubatoren, og flasken slått forsiktig på siden for at cellene skal løsne bedre fra plasten og fra hverandre. Medium ble tilsatt flaskene for å deaktivere trypsinet og blandet uten å skape for mye skum da skum ville redusert celleantallet. Løsningen ble fordelt i rør, tilsatt mer medium og sentrifugert. Deretter ble supernatanten sugd av og cellepelleten resuspendert i nytt medium. Cellesuspensjon ble fordelt i ønsket antall T75- flasker og tilsatt medium, slik at det til sammen i hver flaske var 15-20 ml. Deretter ble cellene inkubert i CO₂ inkubatoren. Det er vist i tidligere forsøk på avdelingen at HeLa cellene vokser raskere enn SiHa cellene [8, 9]. Doblingstid for HeLa ble vist å være 0,9 dager, mens den for SiHa var 1,4.

3.2.3 Telling av celler med Coulter counter

Cellene ble telt med en Coulter counter som beskrevet i vedlegg 3 for å vite hvor mange celler som var i cellesuspensjonen. Coulter counter er et apparat som teller celler ved å detektere endringer i elektrisk strøm i den væsken med celler dras gjennom apparatet [63].

En fortynning av 0,5 ml cellesuspensjon i 19,5 ml fysiologisk saltvann ble laget. Deretter ble cellene telt som beskrevet i vedlegg 3. For å finne celleantall per ml ble celleantallet multiplisert med fortynningsfaktoren som er 40 for denne fortynningen. Antall celler i en T75 flaske ble beregnet ved at antall celler per ml, ble multiplisert med antall ml pelleten var blitt resuspendert i. Deretter ble det beregnet hvor stort cellevolum som måtte fikseres for å få nok celler til de videre forsøkene. Formel 1-3 ble benyttet for disse utregningene. Area ble oppgitt av Coulter counteren, under grafen av celleantallet.

Formel 1 -3 for beregning av celle antall og hvor stort volum en må ha for å få 3-5 millioner celler per fryst rør

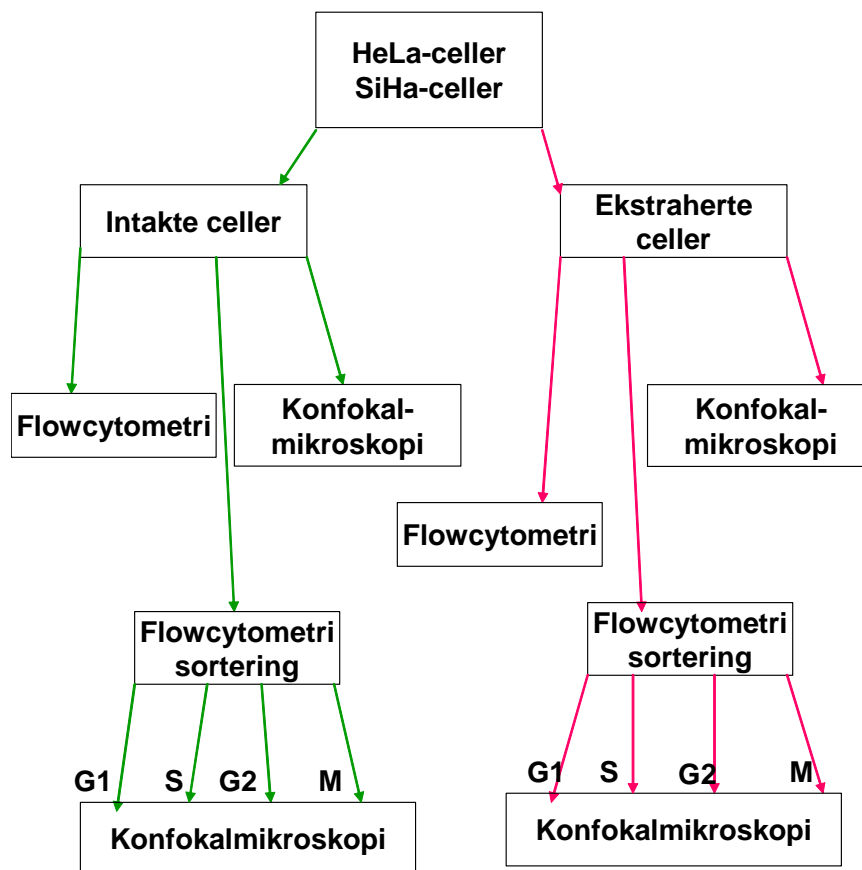
- 1. $(\text{Area}/2 \text{ ml}) \cdot \text{fortynningen} = \text{Antall celler}/\text{ml}$**
- 2. $\text{Antall celler som skal fikseres} / \text{Antall celler}/\text{ml} = \text{Antall ml som inneholder ønsket antall celler til cellefiksering}$**

3. Totalvolum av celleduspensjon/ Antall celler som skal fikseres = Antall rør som kan fryses ned med for ønsket celleantall (resten sås ut i T 75 flasker dersom det er ønskelig)

Det var ønskelig med tre millioner celler der cellene skulle ekstraheres, og fire millioner celler der cellene skulle metanolfikseres. Tallet for de metanolfikserte cellene ble funnet av en tidligere hovedfagsstudent på avdelingen [9].

3.3 Forsøksoppsett

Figur 3.3-1 viser et flytskjema for forsøksoppsett i denne oppgaven.



Figur 3.3-1. Begge cellelinjene ble fikserte med metanol (intakte celler) eller formaldehyd og metanol (ekstraherte celler), og deretter farget før flowcytometri, konfokalmikroskopi, eller sortering med flowcytometri og konfokalmikroskopi.

Alle forsøk ble utført med både HeLa- og SiHa- celler. De samme forsøkene ble utført med intakte og ekstraherte celler. Intakte celler vil si celler som fikseres med metanol, og CKS2-fordelingen er tilnærmet fordelingen ved fikseringstidspunktet. Ekstraherte celler vil si celler der proteiner som ikke er assosiert i kjerneområdet, kan ekstraheres ut til cytoplasma med en detergentbuffer før de fikseres. Fiksering beholder cellene i den fasen av cellyklus de var i rett før tilsetning av metanol eller formaldehyd og metanol. Fikserte celler kan beholdes uendret i fryseren over lengre tid [64]. Cellene kan da brukes til forsøk der cellyklusfase bestemmes, og relativ mengde CKS2 ved hver fase detekteres. De kan også anvendes til forsøk der CKS2-proteinet lokaliseres.

3.4 Fiksering og farging av celler

3.4.1 Preparering av intakte celler

Rør inneholdende rundt 4 millioner celler ble fiksert med metanol som beskrevet i vedlegg 4. Det samme celleantallet ble farget før videre forsøk. Metanol er et polart løsemiddel og vil gjøre cellene noe permeable. Antistoff løsningene vil lettere inntre cellene og farge ulike bestanddeler. Men disse cellene vil være tilnærmet intakte i forhold til ekstraherte celler. De fleste cellysubenheter derfor holdt på samme nivå som ved fikseringstidspunktet, uavhengig av om de var bundet eller ubundet til noe i kjerneområdet.

3.4.2 Preparering av ekstraherte celler

Rør inneholdende rundt 3 millioner celler ble preparert som beskrevet i vedlegg 5. Dette tilsvarer antall celler som ble farget før videre forsøk. En detergentbuffer kalt Larsen-buffer ble brukt for å lysere cellene og gi en suspensjon bestående av cellekjerner[64].

Detergentbufferen besto blant annet av detergenten Nonidet-P40, som lyserte cellemembranen, slik at proteiner som ikke var assosiert i kjerneområdet, kunne ekstraheres fra kjerneområdet. Deretter ble cellene fiksert med formaldehyd. Cellene ble til slutt også fikserte med metanol for å forsikre at forskjeller vist mellom intakte og ekstraherte celler ikke skyldtes metanolen.

3.4.3 Farging av celler for flowcytometri og konfokalmikroskopi

Intakte og ekstraherte celler til flowcytometriforsøk ble farget som beskrevet i vedlegg 6, mens celler til konfokalmikroskopiforsøk ble farget som beskrevet i vedlegg 10.

Hovedprøven ble i alle forsøk tilsatt primærantistoffet mus anti- CKS2, som ble bundet til CKS2-proteinet. Sekundærantistoffet, FITC- konjugert geit anti- mus ble tilsatt både hovedprøven og kontrollprøven. Kontrollprøven ble brukt for å detektere uspesifikk binding av FITC-konjugert geit anti-mus. Sekundærantistoffet ble bundet til primærantistoffet og det konjugerte fluorokromet, FITC farget CKS2. Deteksjon av FITC-signalet ble relatert til CKS2-mengde i cellene.

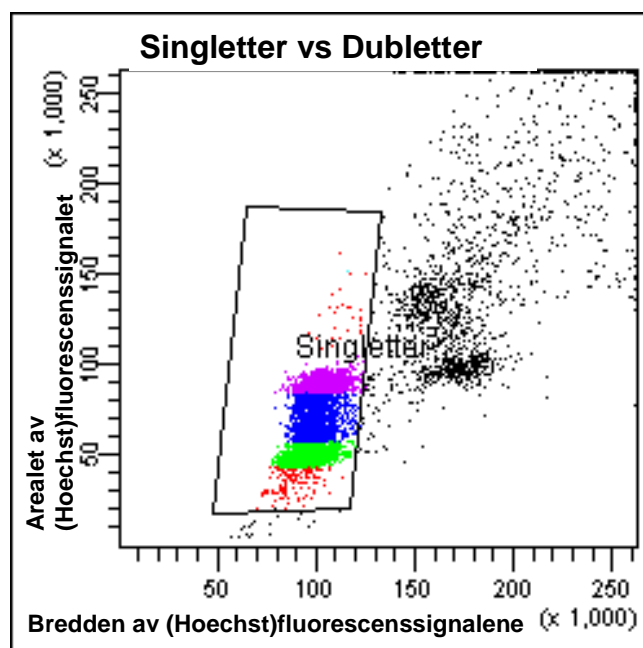
Kanin anti-PH3 er et annet primærantistoff som ble tilsatt både hovedprøvene og kontrollprøvene i alle forsøk. Det var ikke nødvendig å måle uspesifikk binding av dette antistoffet, siden det kun skulle brukes som en mitosemarkør, og ikke til kvantitative formål. Antistoffet ble bundet til fosforylert histon-H3 i mitosens kjerner[65]. Sekundærantistoffet PE- konjugert geit anti- kanin ble tilsatt. Dette sekundærantistoffet ble bundet til primærantistoffet, kanin anti- PH3, slik at M-fase celler ble farget og kunne skilles ut fra de andre cellesyklusfasene. Dette ble som primærantistoffet tilsatt både hovedprøver og kontrollprøver.

Hoechst 33258 ble brukt til å farge DNA i flowcytometriforsøkene og der cellene ble sorterte før konfokalmikroskopi. Endringer i DNA-innhold ble detektert gjennom cellesyklus i flowcytometeret, og relatert til cellesyklusfase [8]. Det ble forventet at proliferende celler i G₂-fase, ville ta opp dobbelt så mye farge i forhold til G₁- fase, fordi G₂- celler inneholder dobbelt så mye DNA

Ingen kontrollprøver ble laget der celler ble farget kun for konfokalmikroskopi, fordi uspesifikk- eller spesifikk binding ikke ble kvantifisert ved bruk av denne metoden. Cellene ble farget for DNA med TO-PRO-3. I forsøk der cellene ikke ble sorterte før mikroskopering, ble det ikke tilsatt Hoechst 33258, siden fluorokromet eksiteres og emitteres av UV-lys. Ellers ble cellene preparert som før flowcytometriforsøkene.

3.5 Flowcytometriforsøk til kvantitative målinger av CKS2

Disse forsøkene ble utført som beskrevet i vedlegg 7. Ulike kalibreringskuler ble kjørt før hvert forsøk for å bestemme overlappen mellom fluorokromer som trengte kompensasjon som for eksempel FITC- % PE og PE- % FITC. Oppsett for kompensasjonen fulgte hele forsøket. Single celler (singletter) ble deretter skilt fra doble celler (dubletter) på dottplottet der arealet av Hoechstsignalet vises i Y-aksen, og bredden av Hoechstsignalet på X-aksen som vist i figur 3.5-1.

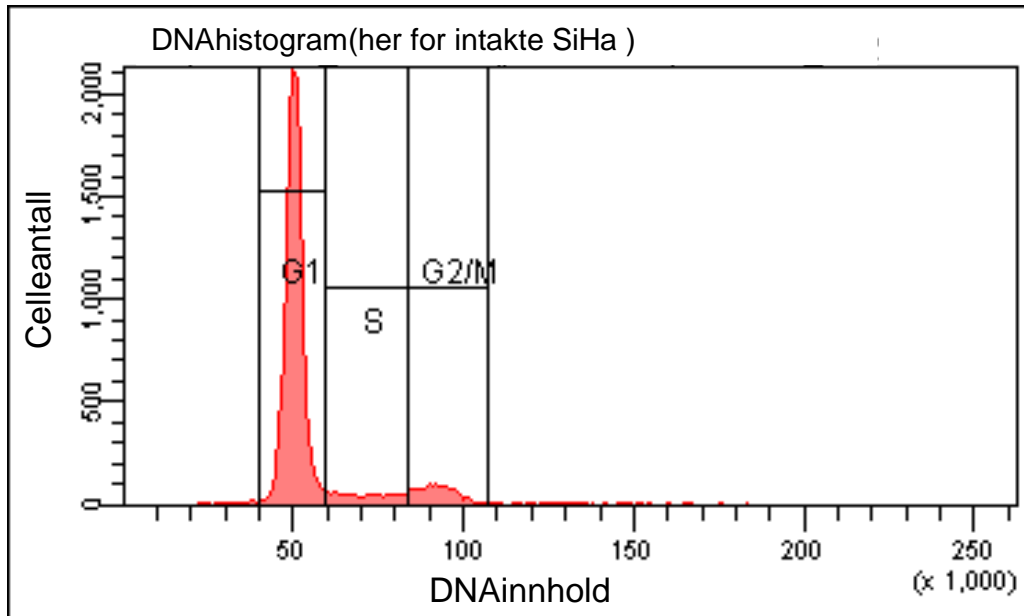


Figur 3.5-1. Y-aksen viser arealet av Hoechstsignalet, mens X-aksen viser bredden av Hoechstsignalet. Singlettene er gatet inn, disse cellene har smalere Hoechstsignaler enn dublettene.

DNA (Hoechst)-, CKS2 (FITC)-, og PH3 (PE)signaler ble målt, og data ble brukt i rådataanalysen.

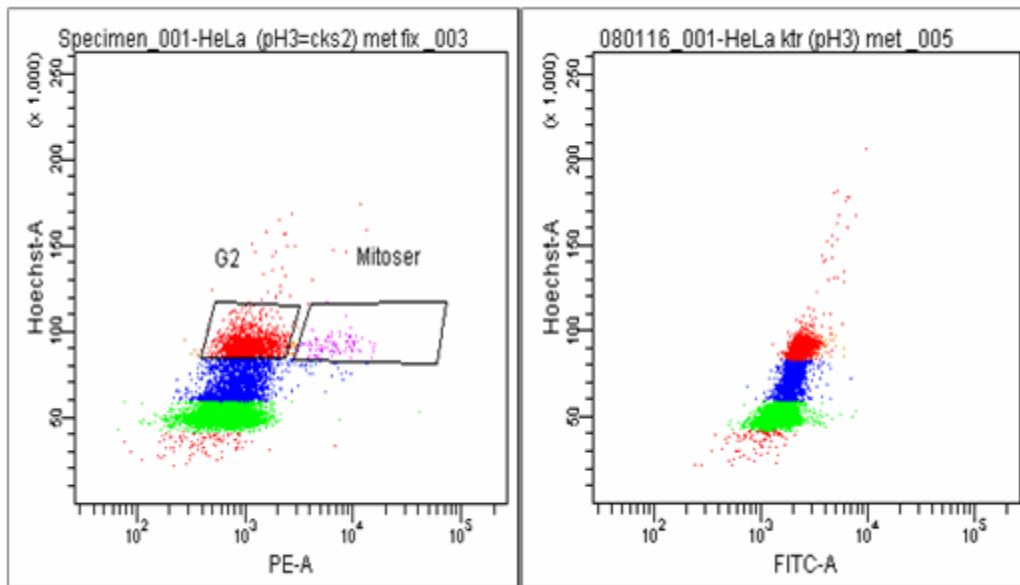
3.5.1 Rådataanalyse

Data fra flowcytometriforsøkene ble brukt for å beregne nettosignal detektert i de ulike prøvene, ved å trekke bakgrunnssignal/fluorescenssignaler til den uspesifikke bindingen fra fluorescenssignalene til den spesifikk bindingen. Data ble funnet ved å selektare ut cellepopulasjoner på bakgrunn av DNA-innhold i DNA-histogrammet som vist i figur 3.5-2.



Figur 3.5-2 De ulike cellyklusfasene er gatet. X-aksen viser DNA-innholdet som arealet av (Hoechst)fluorescenssignalene, og Y-aksen viser celleantallet i hver kanal og cellyklusfase.

Denne selekteringen ble brukt til å skille cellene som var i G_1 -, S-, og G_2 -/M-fase fra hverandre, og ble kalt for å gate. DNA-histogrammet ble alltid gatet slik at G_1 -fase havnet i kanalnummer 50, dermed var det lett å detektere distribusjonsforskjeller av DNA i ulike forsøk. Cellyklusfasene ble gitt ulike farger slik at det var mulig å skille dem på dottplott og histogrammer for CKS2 (FITC) og/eller PH3 (PE /mitosemarkør). PE-signalet gjenspeiler relativt uttrykk av fosforylert histon-H3 og ble brukt for å selektare ut mitosene ved bruk av gater som vist i figur 3.5-3. Figuren viser også et dottplott av CKS2-innhold versus DNA-innhold, denne figuren ble brukt for å finne ut hvordan CKS2-mengden ble fordelt gjennom cellyklus.



Figur 3.5-3. De ulike cellyklusfasene vises i ulike farger. Til venstre vises et dottplott der arealet av PE-signalene er plottet mot arealet av Hoechstsignalene. Dette dottplottet er gattet for å skille mitosene fra G₂-cellene. Til høyre ser vi et dottplott av arealet av FITC-signalene detektert versus arealet av Hoechstsignalene.

Slike dottplott ble også anvendt for å sortere cellene i ulike faser, under cellyklesorteringen. Gatingen gir en tabell der blant annet medianen av FITC-signalene vises. Et eksempel på dette er vist i tabell 3.5-1, for en kontrollprøve inneholdende intakte SiHa-celler.

Tabell 3.5-1. Her vises data for uspesifikk binding av intakte SiHa, ved de ulike cellyklusfasene. Den tredje kolonnen viser tallene for FITC- medianen som er brukt i rådataanalysen.

Experiment Name: 070924_001					
Specimen Name: Specimen_001					
Tube Name: SiHa ktr (pH3) met fix_001					
Record Date: Sep 24, 2007 1:34:19 PM					
Population	#Events	%Parent	FITC-A Median	PE-A Median	Hoechs... Median
All Events	10,000	####	1,150	498	49,098
Singletter	10,000	100.0	1,150	498	49,098
G1	8,183	81.8	1,091	469	48,488
S	937	9.4	1,532	638	70,919
G2/M	729	7.3	1,839	905	91,061
Mitoser	72	0.7	1,856	6,372	88,508
G2	639	6.4	1,857	868	91,300

Nettosignaler ble beregnet på bakgrunn av disse tallene. Deretter ble både gjennomsnitt og standardavvik beregnet. Beregningene ble utført for å finne relativ mengde CKS2-mengde i de ulike fasene i begge cellelinjene, og forskjeller i uttrykk mellom intakte og ekstraherte celler.

Flowcytometeret ble også brukt til å beregne ploiditet (DNA-indeks), som beskrevet i vedlegg 8. Reh-celler, humane leukemi forløper B- celler [66]ble brukt som de normale, diploide cellene. DNA-indeks ble beregnet ifølge formel 4, og ble forventet å ligge på 82 ± 2 kromosomer for HeLa som tilsvarer 1,78[67].

Formel 4

(Medianen av Hoechstsignalenes areal i G_1 -fase for HeLa- eller SiHa celler)/

(Medianen av Hoechstsignalenes areal i G_1 -fase for Reh- celler) = DNA-indeks

Medianverdi av Hoechstsignalenes areal (oppgis av programvaren) ble brukt som data i formlene, siden intensiteten av Hoechstsignalene gjenspeiler relativ DNA-innhold i cellene.

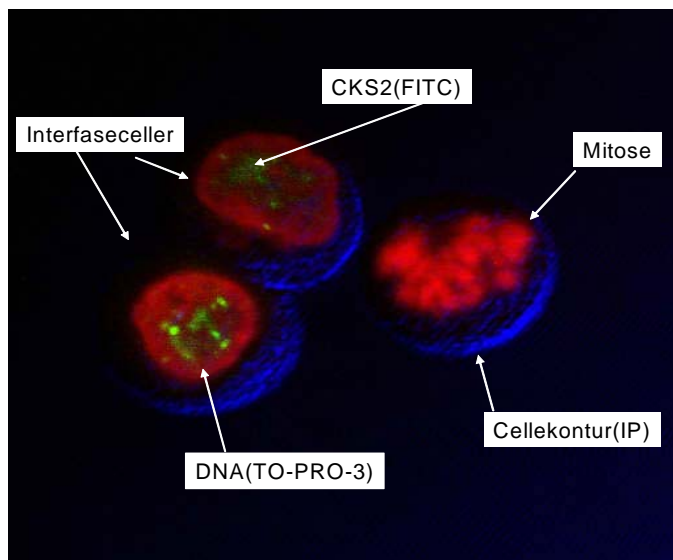
3.5.2 Cellesortering

Cellene ble sortert som beskrevet i vedlegg 11 ved bruk av BD-FACS-Vantage-SE flowcytometeret. Cellene ble på bakgrunn av intracellulære forskjeller sortert ut som G₁-, S-, G₂-, og M-faseceller på hvert sitt objektglass. Cellene ble farget med Hoechst 33258 før celledisagregering, for å detektere DNA-innhold med flowcytometeret. De ulike celledisagregasjonsfasene ble gattet på dottplottet og cellene ble sortert ut. Gatene ble satt godt innenfor fasegrensen for å sikre at cellene tilhørte den ønskede celledisagregasjonsfasen. Samtidig ble gaten satt bredt nok for å forhindre utelukkelse av celler i tidlig og sen del av hver fase. En antifadeforløsning inneholdende TO-PRO-3, ble brukt for å farge DNA etter celledisagregering, slik at DNA også kunne detekteres i konfokal laserskanning mikroskopet.

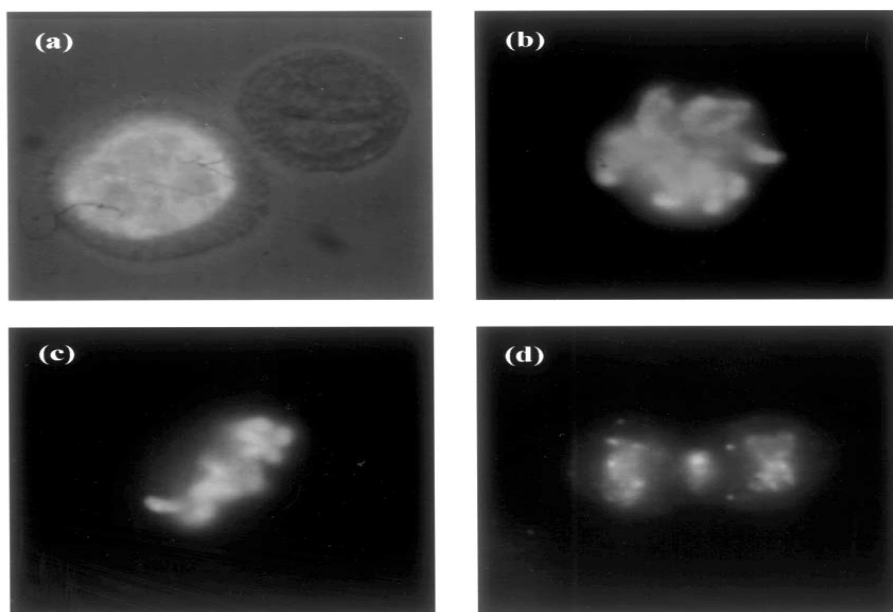
3.6 Konfokalmikroskopiforsøk

Metanolfikserte celler ble brukt for å lokalisere CKS2-proteinet i intakte celler. Ekstraherte celler ble brukt for å detektere om CKS2 var lokalisert assosiert i kjerneområdet, eller i cytoplasma. Konfokalmikroskopiforsøkene ble utført som beskrevet i vedlegg 12. Alle bildene ble tatt med 63x1,32 NA oljeimmersjons-objektivet. Det ble tatt opp bilder som viste CKS2 (FITC) som grønt og DNA (TO-PRO-3) som rødt. Skanningboks-størrelse ble satt til 512x512 piksler. Det ble også tatt interferenskontrastbilder i noen utvalgte forsøk. Interferenskontrastbildene viste cellekonturen og det var dermed lettere å detektere om CKS2-proteinet var lokalisert i kjerneområdet eller i cytoplasma som vist i figur 3.6-1.

Interfaseceller ble detektert som runde celler som vist i figur 3.6-1. M- fase som inndeles i underfasene prometafase, metafase og telofase ble detektert på bakgrunn av kjent litteratur, og cellenes knudrete utseende. Profaseceller hadde fremdeles kjernemembranen i behold som vist i figur 3.6-2, og var derfor ikke knudrete, men runde som interfasecellene.



Figur 3.6-1. CKS2 er grønnfarget og DNA er rødfarget. Interferenskontrasten som viser cellekonturene er blåfarget.



Figur 3.6-2. Underfaser av mitosen identifisert i et fluorescensmikroskopet. (a) viser profase som ligner på en interfasecelle siden kjernemembranen ikke er degradert. (b) viser prometafase som har en rund men ganske knudrete struktur som skiller seg fra profasen. (c) viser metafase som her en avlang knudrete struktur. (d) viser telofasen der cellen er på vei til å deles i to identiske datterceller [68].

3.6.1 Kvantifisering av CKS2-foci

Antall celler med CKS2 i foci i kjernen, og antall foci per celle ble kvantifisert, ved å telle celleantallet med CKS2-foci og deretter antall CKS2-foci per celle i 58 usorterte, ekstraherte celler fra både HeLa og SiHa. Medianen av fociantallet ble også beregnet ved bruk av Excel-regneark.

3.7 T-test

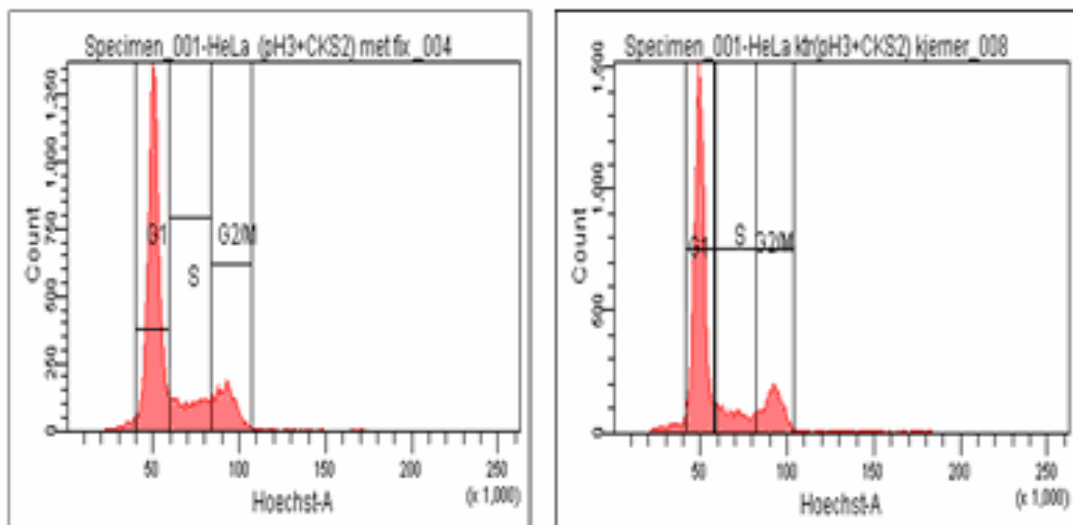
Data fra rådataanalysen av flowcytometriresultatene, ble satt inn i dataprogrammet SigmaStat som beskrevet i vedlegg 9. Med dette programmet ble det utført t-tester som beregnet om forskjeller funnet for CKS2-fordelingen var signifikante. p- verdien ble satt til 0,05 i denne oppgaven. I t-tester der p-verdien ble beregnet til å være under 0,05 ble resultatene ansett som signifikante. t-tester der p-verdien ble beregnet til å være over 0,05 ble ikke resultatene ansett som signifikante. Siden p-verdien ble satt til 0,05 var det opptil 5 % sannsynlighet for at resultater oppsto ved en tilfeldighet. Det var dermed 95 % sikkert at resultatet ikke skyldtes en tilfeldighet.

4. Resultater

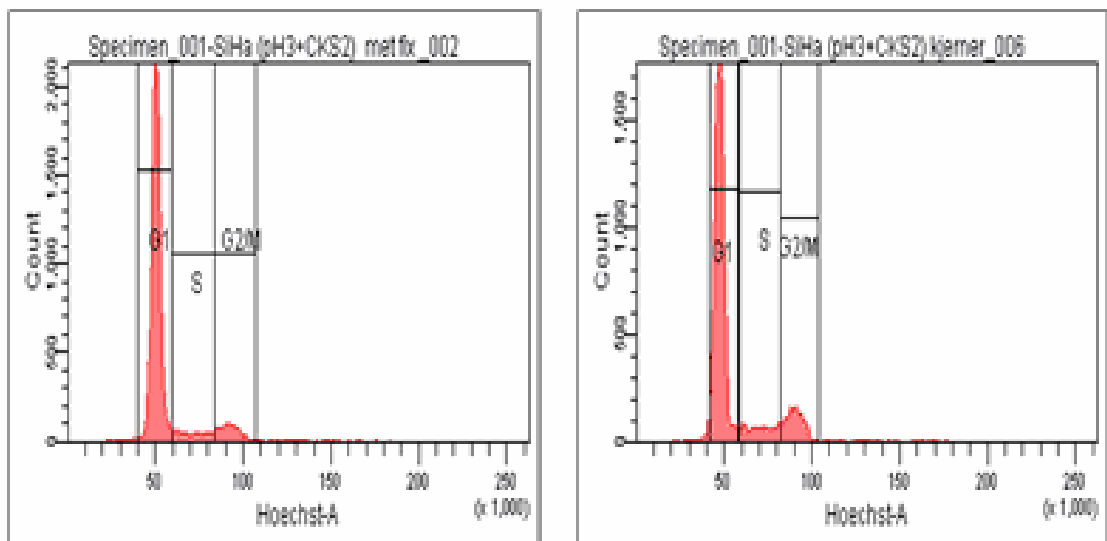
4.1 Flowcytometri

4.1.1 DNA-fordelingen i HeLa og SiHa

Histogrammene i figur 4.1-1 og 4.1-2 viser celledistribusjonen gjennom celledyklus, der X-aksen ble brukt for å vise DNA-innholdet i cellene mot celleantallet på Y-aksen. DNA-histogrammene var jevne selv etter ekstrahering, og som forventet var det flest celler i G₁-fase og færrest celler i G₂-/M-fase. Figur 4.1-1 viste dette for HeLa-cellene, mens figur 4.1-2 viste dette for SiHa-cellene.



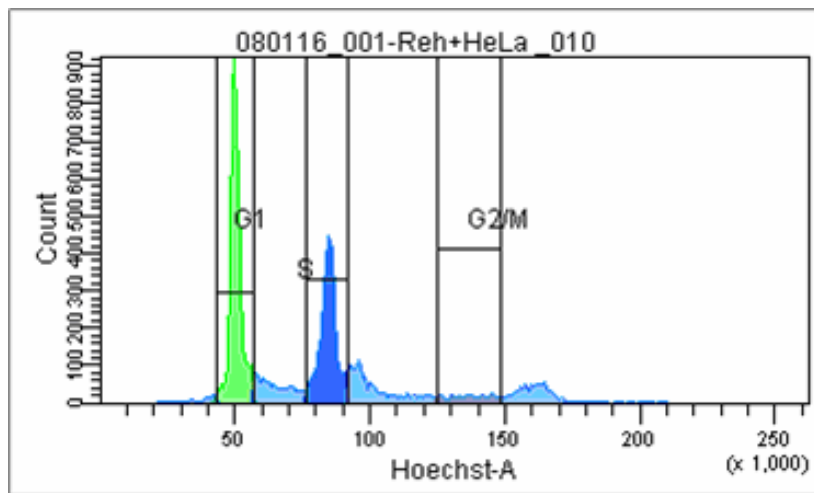
Figur 4.1-1. DNA-innhold i HeLa-cellene vises på X-aksen, og celleantall i hver celledyklusfase vises på Y-aksen. Til venstre er DNA-histogrammet for et forsøk utført med intakte celler. Til høyre er et DNA-histogram for et forsøk utført med ekstraherte celler.



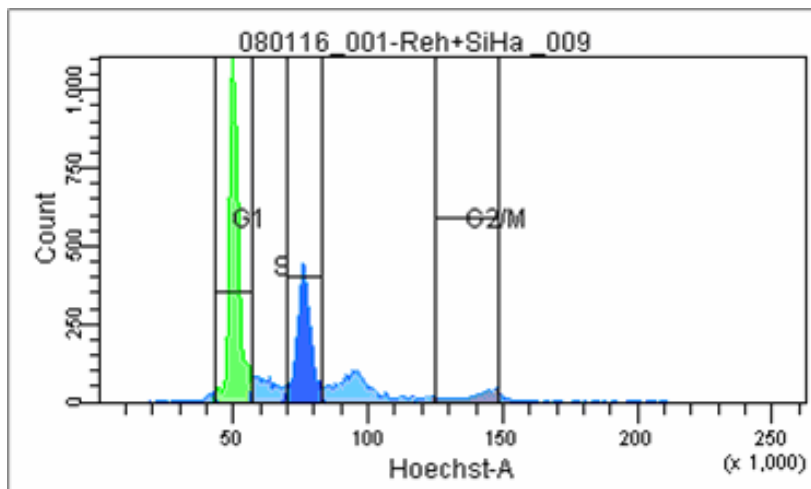
Figur 4.1-2. DNA-innhold i SiHa-cellene vises på X-aksen, og celleantall i hver cellesyklusfase vises på Y-aksen. Til venstre er et DNA-histogram for et forsøk utført med intakte celler. Til høyre er et DNA-histogram for et forsøk utført med ekstraherte celler.

4.1.2 Beregning av DNA-indeks

Histogrammene 4.1-3 og 4.1-4 fra ploiditetsforsøkene ble brukt for å finne DNA-indeksen for begge cellelinjene. Reh-cellene i G₁- fase ble gitt en lysegrønn farge i programvaren, mens HeLa- og SiHa-cellene i G₁- fase ble gitt en mørkeblå farge, og deres andre faser ble gitt lyseblå. På bakgrunn av disse fargene kunne Reh-cellene skilles fra HeLa og SiHa som vist i figur 4.1-3 og 4.1-4.



Figur 4.1-3. Reh-cellene er gatet der G_1 -toppen er i kananummer 49,80 som vist på X-aksen, mens HeLa-cellene er gatet der den er i 84,61. Som vist i histogrammet ligger HeLa-cellenes G_1 -celler i Reh-cellenes S- fase.



Figur 4.1-4. Reh-cellene er gatet der G_1 -toppen er i kanalnummer 50 , mens SiHa cellene er gatet der den er i 76,20. Som vist i histogrammet ligger SiHa-cellenes G_1 -celler i Reh cellenes S- fase.

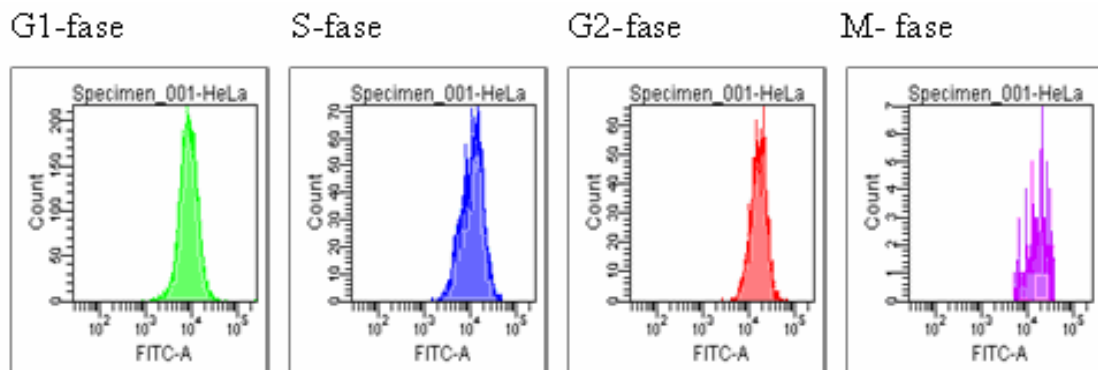
HeLa-cellenes DNA-indeks ble beregnet til 1,70, mens SiHa-cellenes DNA-indeks ble beregnet til 1,52 som vist i tabell 4.1-1. Beregningene ble utført på bakgrunn av data som ble funnet som beskrevet i vedlegg 8.

Tabell 4.1-1. Verdiene for G₁- cellene ved ploiditetsforsøket.

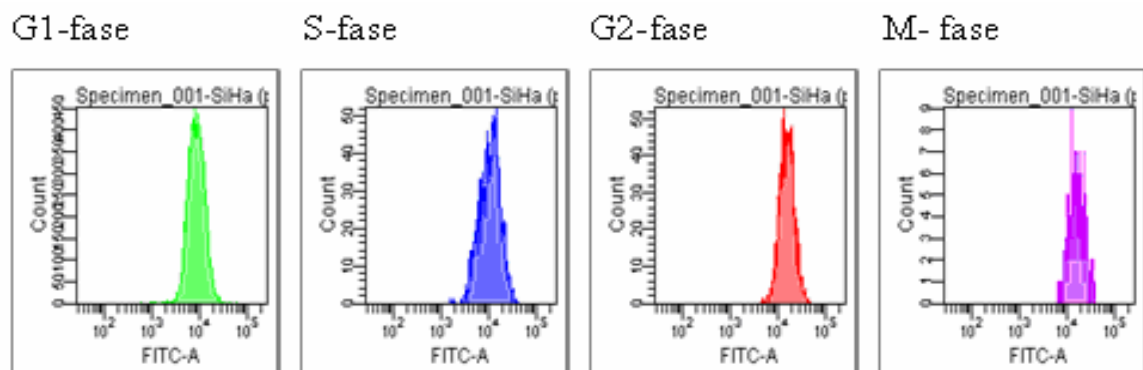
Cellelinje	Hoechst -A medianen for HeLa- og SiHa-cellene	Hoechst -A medianen for Reh-cellene	DNA-indeks
G ₁ - celler fra HeLa	84,61	49,80	1,70
G ₁ - celler fra SiHa	76,20	50,00	1,52

4.1.3 CKS2-innhold i cellene gjennom cellesyklus

Histogrammene i figur 4.1-5 og 4.1-6 viser arealet av FITC-signalet og dermed CKS2-distribusjonen i hver cellesyklusfase. Figurene ble brukt for å vise CKS2-mengde i forhold til antall celler. Siden fordelingene var forholdsvis smale i alle faser var det lite variasjon om medianen og dermed mindre usikkerhet med hensyn til resultatene. Celleantallet var lavest i M- fase og høyest i G₁- fase. Dette stemte med hvordan DNA-histogrammene så ut.



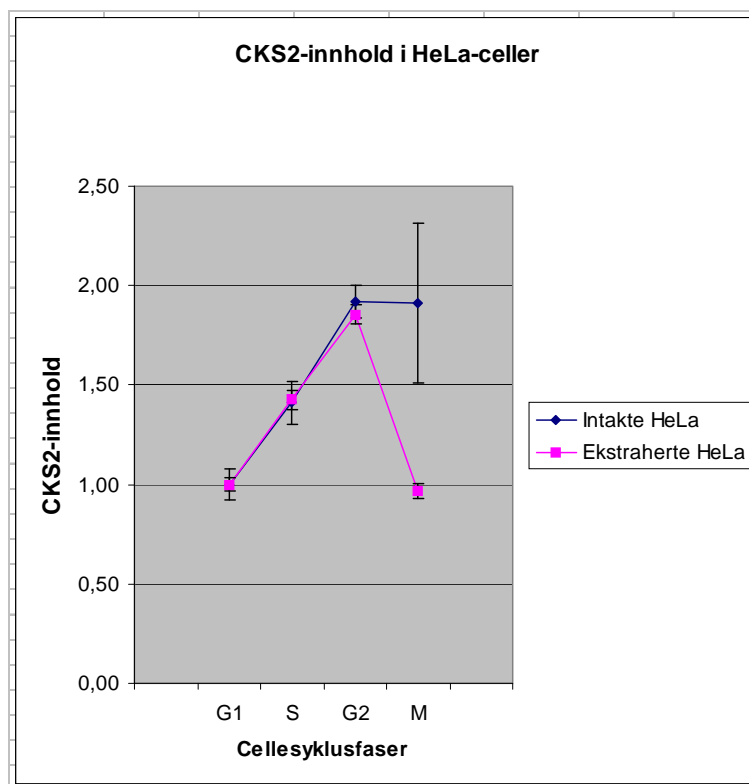
Figur 4.1-5. Dette er et typisk eksempel på hvordan CKS2-innholdet i metanolfikserte HeLa-celler endrer seg i løpet av cellyklus



Figur 4.1-6. Dette er et typisk eksempel på hvordan CKS2-innholdet i metanolfikserte SiHa-celler endrer seg i løpet av cellyklus

4.1.4 CKS2-innhold i gjennomsnitt relatert til G₁-nivå

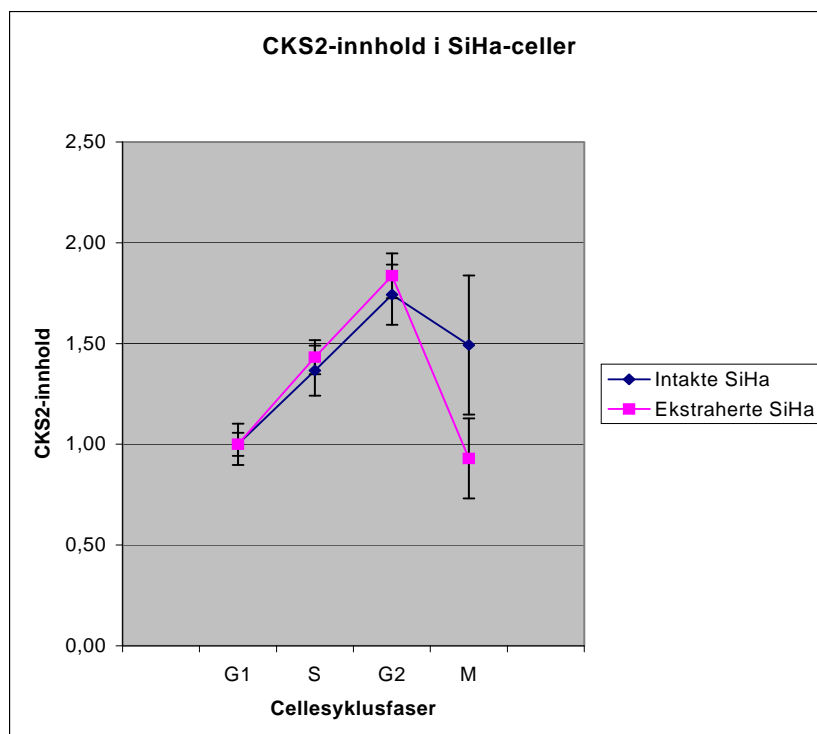
Data for CKS2-mengde gjennom cellesyklus ble brukt til å lage kurver for intakte og ekstraherte celler for HeLa og SiHa. Figur 4.1-7 viser CKS2-innholdet i hver cellesyklusfase relatert til CKS2-nivået i G₁-fase i HeLa. CKS2-mengden økte til omlag det dobbelte fra G₁-til og med G₂-fase i både de intakte og ekstraherte HeLa. Det ble vist en synlig forskjell i CKS2-innholdet i mellom de intakte og ekstraherte HeLa-cellene i M- fase, som vist i figur 4.1-7. Målinger som ble utført på de intakte HeLa-cellene viste at CKS2-nivået holdt seg tilnærmet stabilt i M- fase. For ekstraherte celler ble det detektert en reduksjon i CKS2-nivået i M-fasen. CKS2-nivået for de intakte cellene var tilnærmet den som ble funnet i G₂-fase, mens CKS2-nivået i de ekstraherte mitosene var tilnærmet G₁-cellenes CKS2-innhold.



Figur 4.1-7. Figur. CKS2-innholdet i HeLa-celler er beregnet relatert til CKS2-nivået i G₁- fase. Middelerdi \pm standardavvik basert på tre forsøk er vist her.

Forskjellen i CKS2-nivået i M- fase i de ekstraherte versus de intakte cellene ble vist å være signifikant ifølge t-testen som ble utført med data fra 3 paralleller av forsøket ($p = 0,016$).

CKS2-innholdet relatert til CKS2-nivået i G_1 -fase i SiHa-cellene gjennom cellesyklus vises i figur 4.1-8. CKS2-mengden økte til omlag det dobbelte fra G_1 - til og med G_2 -fase i både intakte og ekstraherte SiHa-celler. Det ble også i denne cellelinjen detektert en forskjell i CKS2-nivået i M-fase, mellom intakte og ekstraherte celler. Som for HeLa cellene ble det detektert en reduksjon i CKS2-nivået i M-fase i de ekstraherte cellene. Det ble detektert en svak reduksjon i CKS2-nivået også i de intakte cellene. I de ekstraherte cellene falt CKS2-nivået ned til G_1 -nivå, mens i de intakte cellene falt de til like under G_2 -nivå.



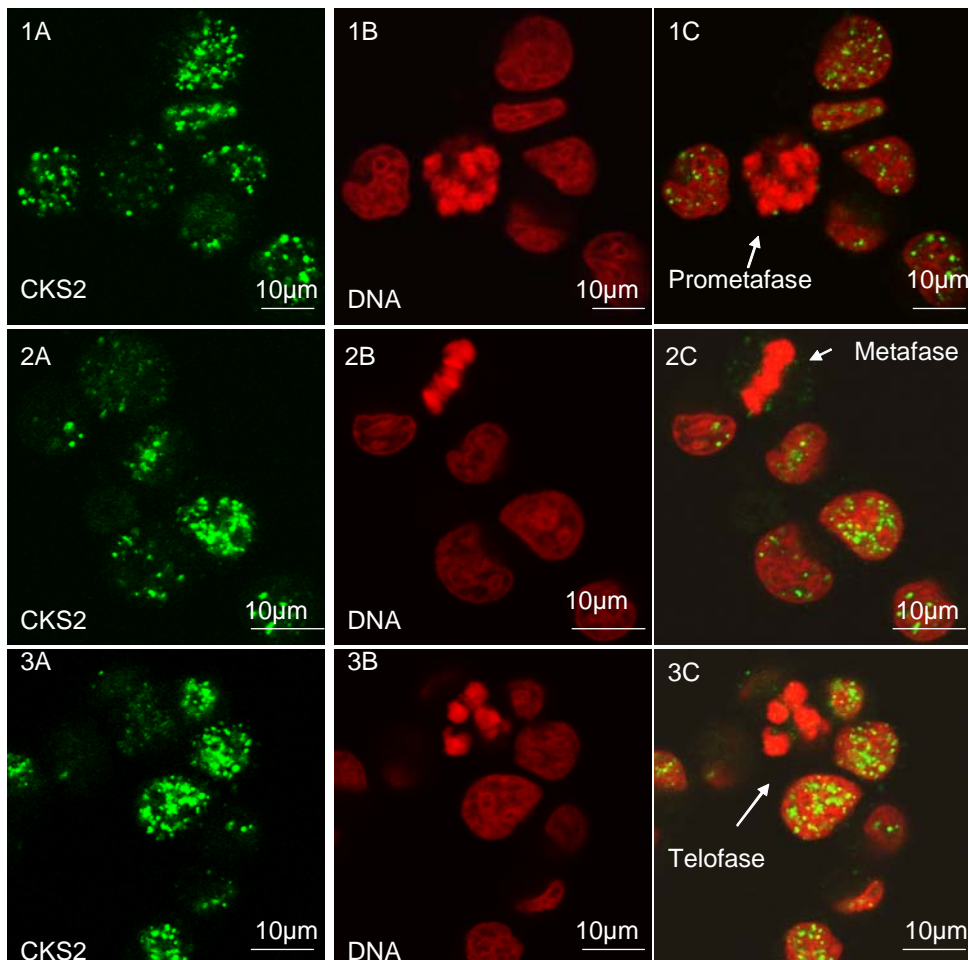
Figur 4.1-8. CKS2-innholdet i SiHa-cellene er beregnet relatert til CKS2-nivået i G_1 - fase. Middelerverdi \pm standardavvik basert på tre forsøk er vist her.

Ifølge t-testen var ikke forskjellen i CKS2- nivået i M-fase mellom de intakte og ekstraherte SiHa-cellene signifikant etter at det var utført tre paralleller av forsøket ($p = 0,071$).

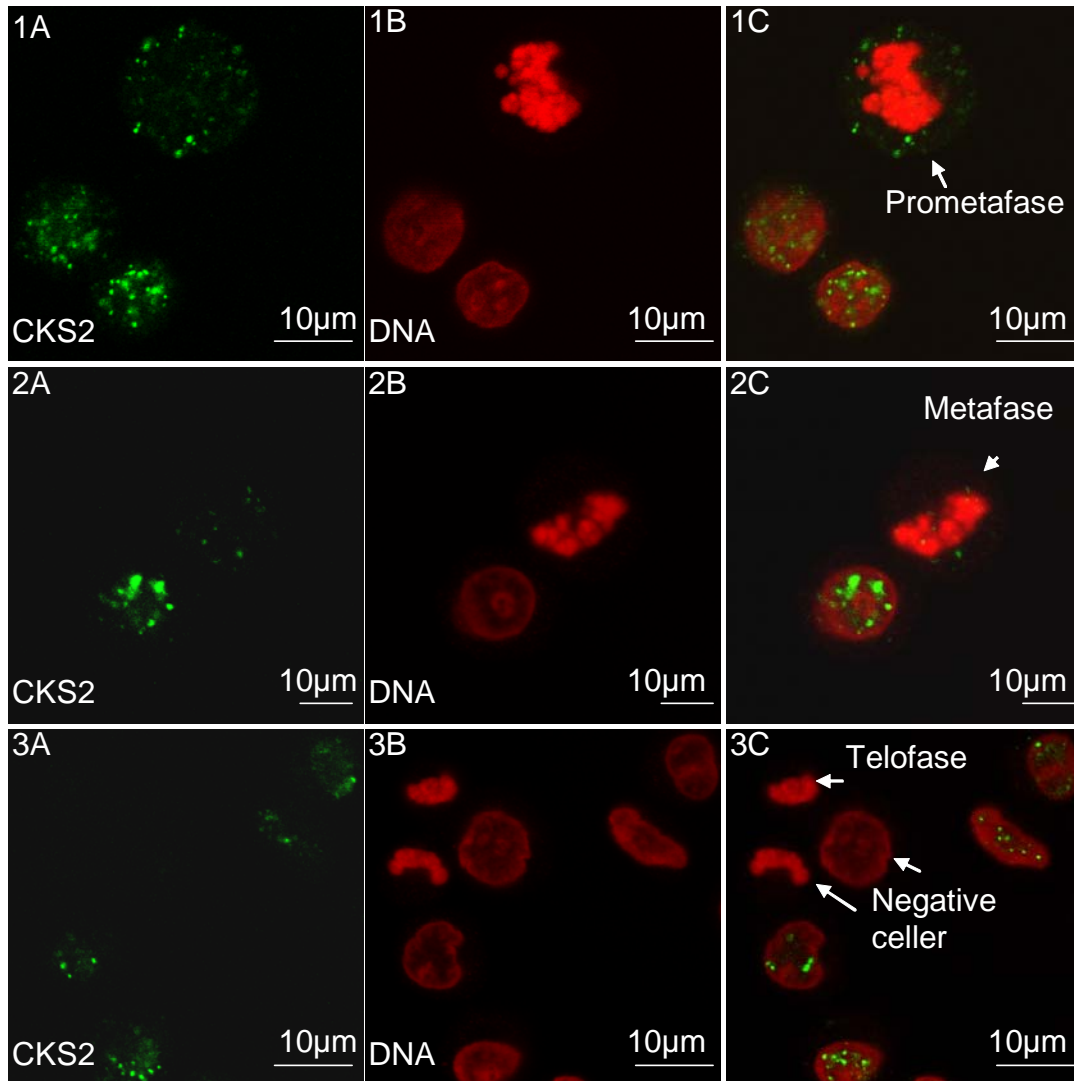
4.2 Konfokalmikroskopi

4.2.1 Lokalisasjon av CKS2 i HeLa og SiHa

I figur 4.2-1 og figur 4.2-2 vises lokalisasjonen av CKS2 i prometafase, metafase og telofase, i tillegg til flere interfaseceller i intakte HeLa og SiHa.

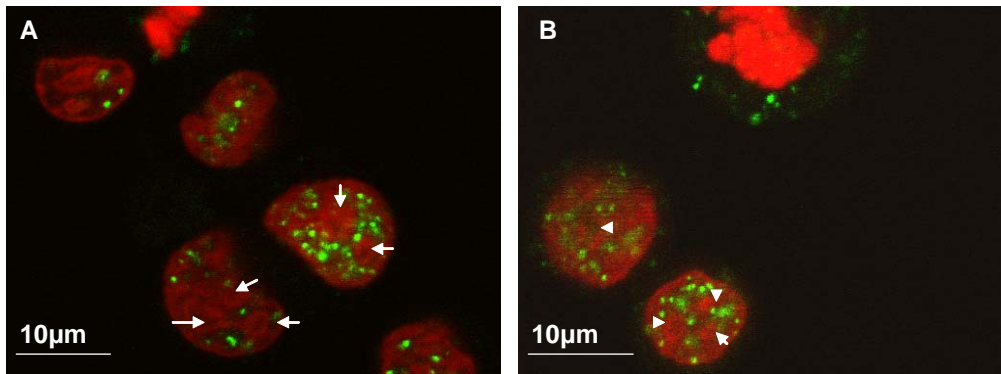


Figur 4.2-1 Midtsnittsbilder av intakte HeLa-celler der CKS2(FITC)er farget grønt og DNA(TO-PRO-3) er farget rødt. De umerkede cellene er i interfase. Bilde 1A-1C viser midtsnittet av en prometafase og flere interfaseceller. Bilde 2A-2C viser midtsnittet av en metafase og flere interfaseceller. Bilde 3A-3C viser midtsnittet av en telofase og flere interfaseceller. CKS2 er hovedsakelig lokalisert i foci i kjernen i interfasecellene, mens i mitosene er CKS2-foci hovedsakelig lokalisert i cytoplasma.



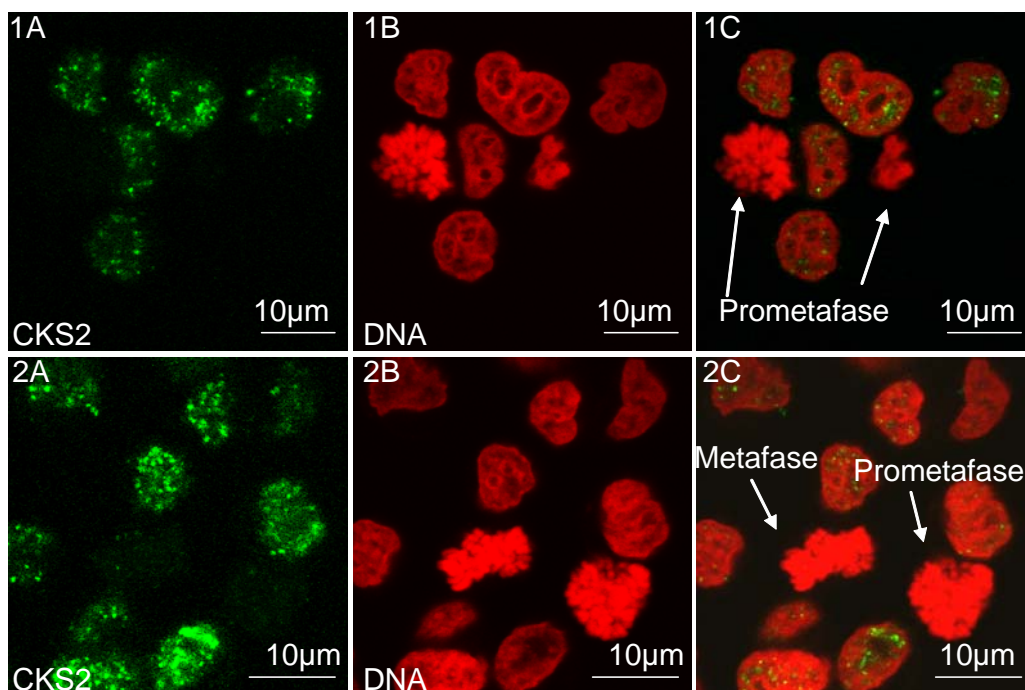
Figur 4.2-2 Midtsnittsbilder av intakte SiHa-celler der CKS2(FITC)er farget grønt og DNA(TO-PRO-3) er farget rødt. De umerkede cellene er i interfase. Bilde 1A-1C viser midtsnittet av en prometafase og flere interfaseceller. Bilde 2A-2C viser midtsnittet av en metafase og flere interfaseceller. Bilde 3A-3C viser en telofase og flere interfaseceller, der CKS2 i noen celler er fraværende. CKS2 er hovedsakelig lokalisert i foci i kjernen i interfasecellene, mens CKS2-foci i mitosene er hovedsakelig lokalisert i cytoplasma.

I intakte interfaseceller var CKS2 lokalisert i foci i kjernen, både i HeLa og SiHa som vist i figur 4.2-1 og 4.2-2. I M-fase var CKS2 ikke assosiert med kjerneområdet, men hovedsakelig i foci i cytoplasma. Noe CKS2 var også fordelt diffust i cellene både i interfase og M-fase. I noen celler var CKS2 fraværende i hele cellen som vist på bilde 3A og 3C i figur 4.2-2. CKS2 ble ikke detektert i nukleoli som vist i figur 4.2-3.

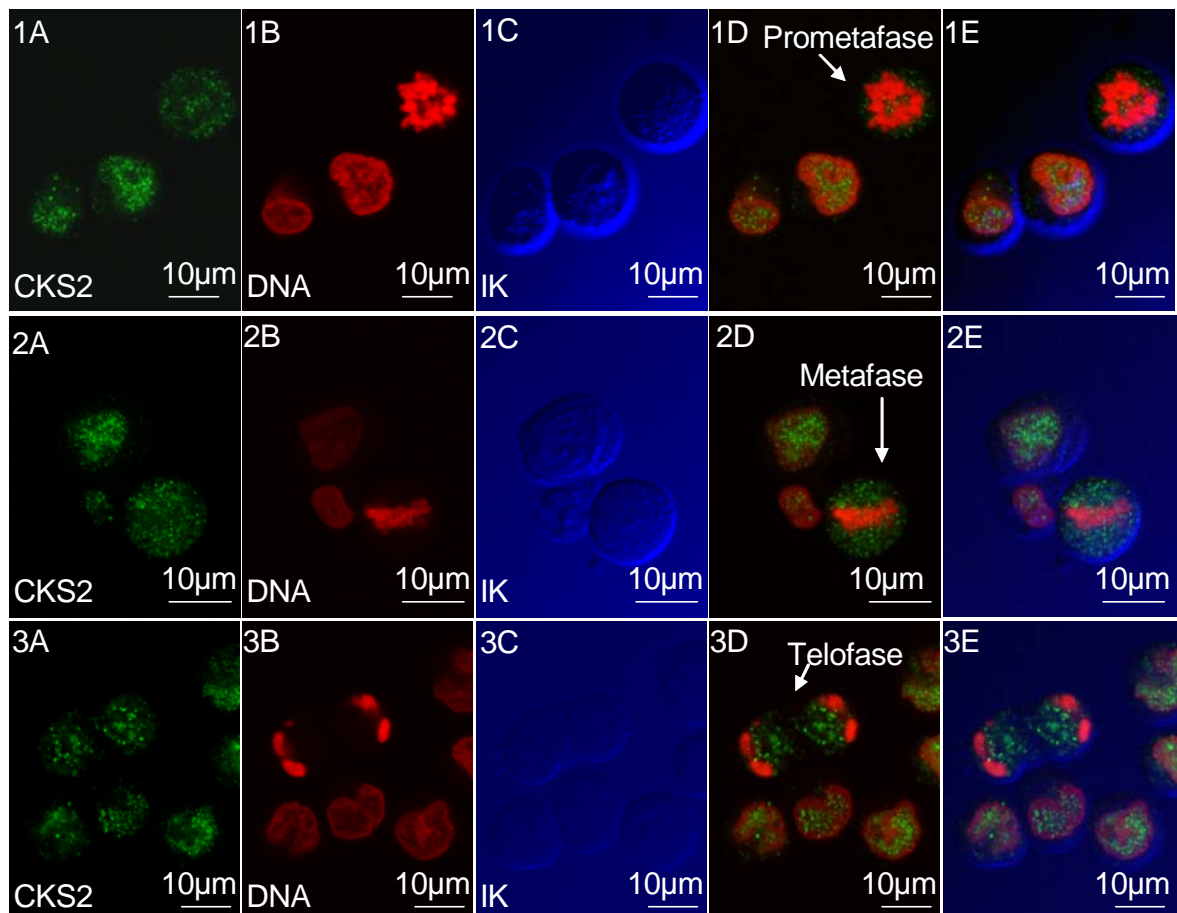


Figur 4.2-3 Nukleoli er merket med små hvite piler. DNA(TO-PRO-3) vises i rødt og CKS2(FITC) vises i grønn. Nukleoli er merket med små hvite piler i kjernen. CKS2 ble ikke detektert i nukleoli i HeLa (A) eller SiHa (B).

Som vist i figur 4.2-4 og 4.2-5 var CKS2-lokalisasjonen i ekstraherte celler tilnærmet lokalisasjonen av proteinet i de intakte cellene.

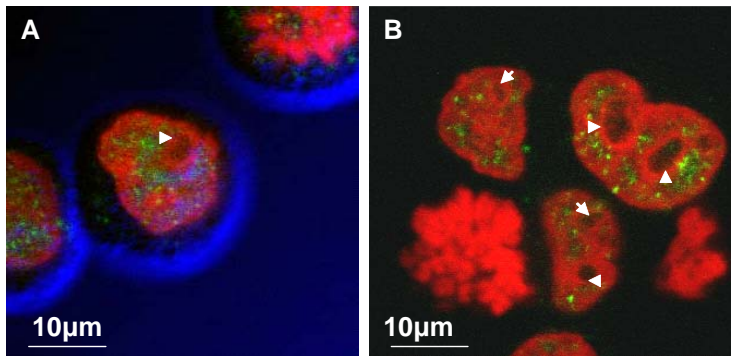


Figur 4.2-4 Midtsnittsbilder av ekstraherte HeLa-celler der CKS2(FITC) er farget grønt og DNA(TO-PRO-3) er farget rødt. De umerkede cellene er i interfase. Bilde 1A-1C viser midtsnittet av to prometafaseceller og flere interfaseceller. Bilde 2A-2C viser midtsnittet av en metafase, en prometafase og flere interfaseceller. CKS2 er hovedsakelig lokalisert i foci kjernen i interfasecellene, mens i mitosene er CKS2-foci hovedsakelig lokalisert i cytoplasma



Figur 4.2-5 Midtsnittsbilder av ekstraherte SiHa-celler der CKS2(FITC)er farget grønt, DNA(TO-PRO-3) er farget rødt og interferenskontrasten(IK) som viser cellekonturen er vist i blått. De umerkede cellene er i interfase. Bilde 1A-1E viser midtsnittet av en prometafase og flere interfaseceller. Bilde 2A-2E viser midtsnittet av en metafase og flere interfaseceller. Bilde 3A-3E viser midtsnittet av en telofase og flere interfaseceller. CKS2 er hovedsakelig lokalisert i kjernen i interfasecellene, mens det i mitosene er hovedsakelig lokalisert i cytoplasma.

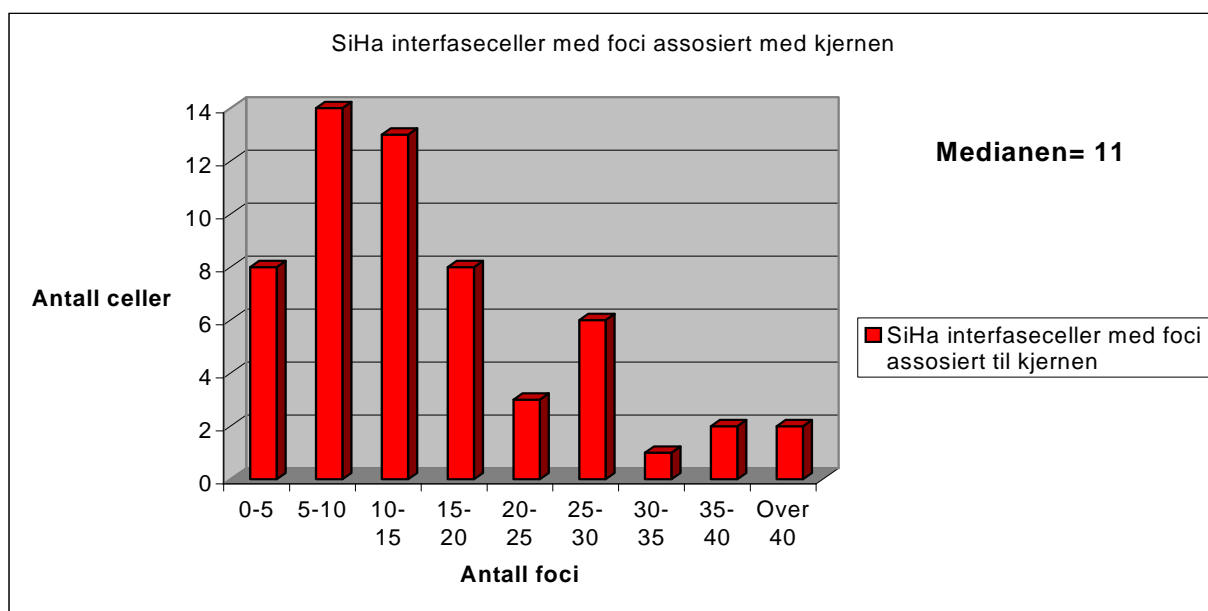
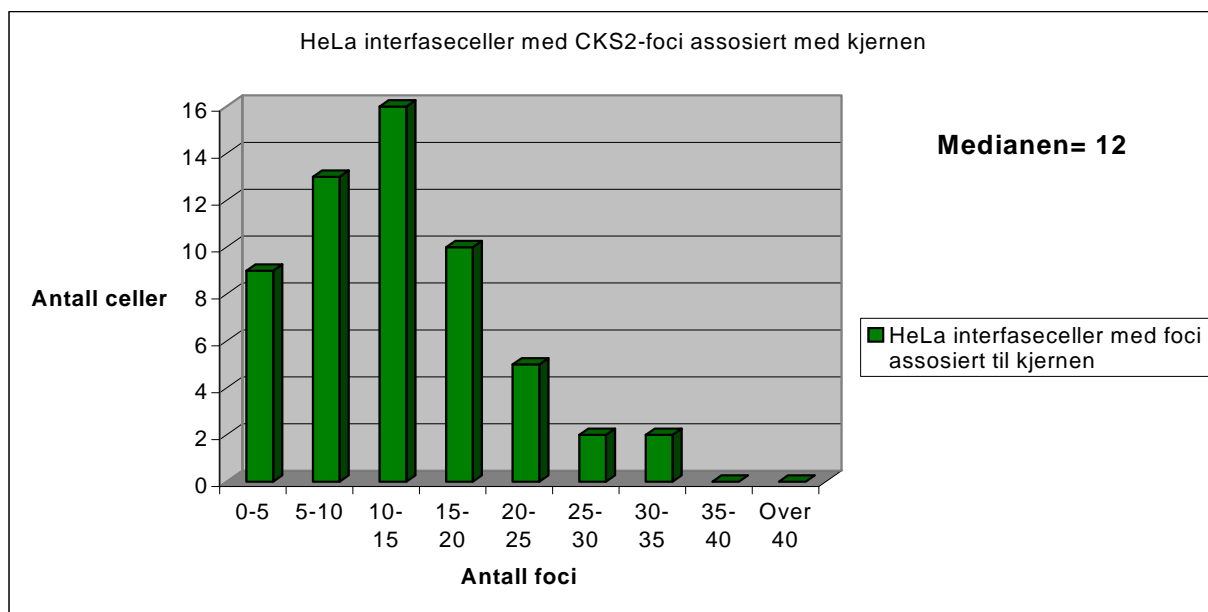
I ekstraherte interfaseceller var CKS2 lokalisert i foci i kjernen i både HeLa og SiHa som vist i figur 4.2-4 og figur 4.2-5. I mitosene var CKS2 lokalisert i foci i cytoplasma. Det ble ikke detektert foci assosiert med kjerneområdet i mitosene. I HeLa var CKS2 ikke lenger detekterbar i de fleste mitosene som vist i figur 4.2-4, mens i SiHa var CKS2-foci hovedsakelig lokalisert i cytoplasma. Noe CKS2 var diffust fordelt også i de ekstraherte cellene i interfase og M-fase. CKS2 ble heller ikke detektert i nukleoli i de ekstraherte cellene som vist i figur 4.2-6.



Figur 4.2-6 DNA(TO-PRO-3) vises i rødt og CKS2(FITC) vises i grønt. Nukleoli er merket med små hvite piler i kjernen. CKS2 er ikke detektert i nukleoli i ekstraherte (A)HeLa eller (B)SiHa.

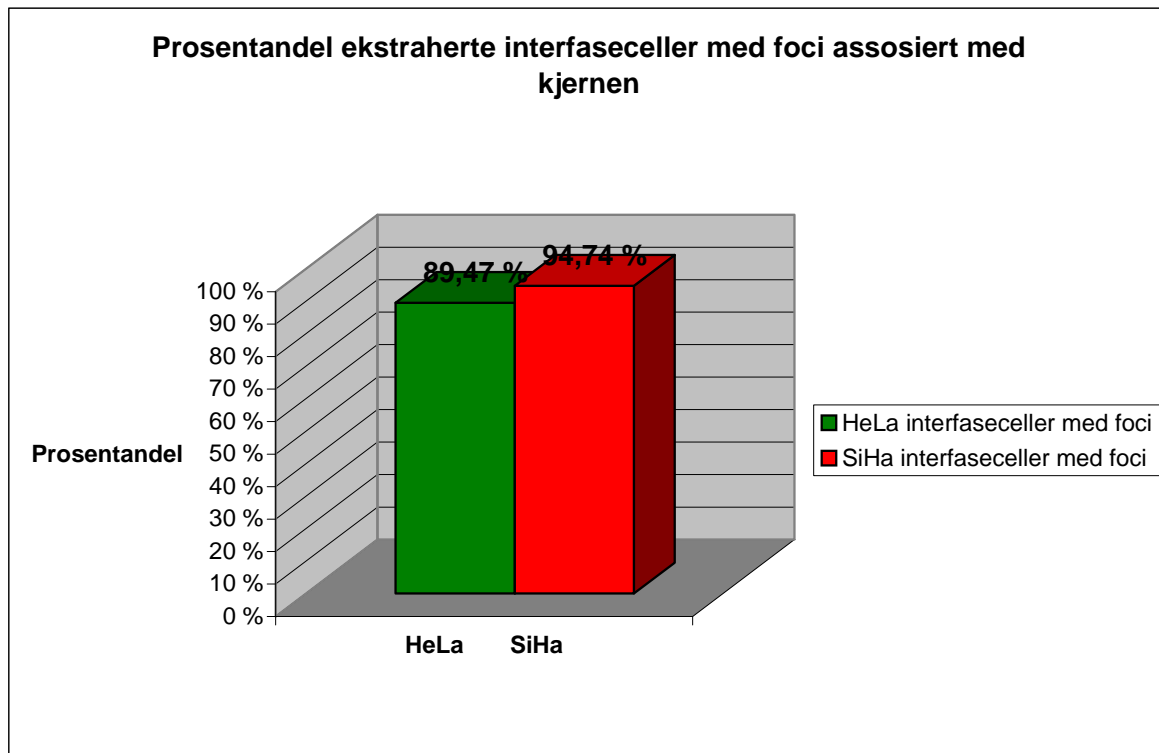
4.2.2 Kvantitativ analyse av fociantallet

Antall foci assosiert med kjerneområdet ble kvantifisert for 58 ekstraherte celler fra hver cellelinje og et diagram for dette er vist i figur 4.2-7. Flertallet av HeLa-cellene hadde 10-15 foci assosiert med kjernen, mens flertallet av SiHa-cellene hadde 5-10 foci assosiert med kjernen. Medianen av antall foci per midtsnittsbilde av HeLa var 12, mens den var 11 foci per midtsnittsbilde for SiHa. Figuren viser den stor variasjonen i fociantall per celle som ble detektert.



Figur 4.2-7 Den øverste figuren viser fociantall-fordelingen for de ekstraherte HeLa- cellene, mens den nederste viser det samme for SiHa- cellene. Medianen for HeLa cellenes fociantall er 12, mens medianen for SiHa er 11.

Prosentandel interfaseceller med og uten foci ble også beregnet som vist i figur 4.2-8. Interfaseceller uten foci i kjernen hadde heller ikke noe diffust CKS2 fordelt i cellen. Disse cellene var CKS2-negative.



Figur 4.2-8 89,47 % av de ekstraherte HeLa- interfasecellene, og 94,74 % av de ekstraherte SiHa- interfasecellene har CKS2-foci i kjernen.

Histogrammet i figur 4.2-8 viste at 10,53 % av de analyserte HeLa-interfasecellene, og 5,26 % av de analyserte SiHa-interfasecellene var CKS2-negative.

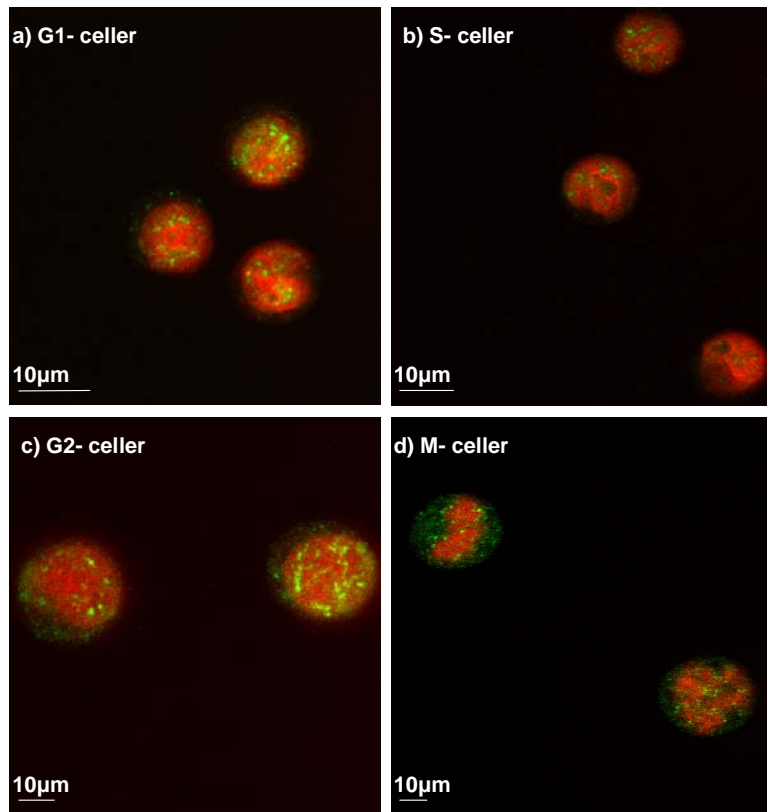
4.3 Konfokalmikroskopering etter celledortering

4.3.1 Deteksjon av CKS2 i ulike celledyklusfaser i HeLa

Cellene ble sortert i ulike celledyklusfaser før mikroskopering i de videre forsøkene for å kartlegge om de CKS2-negative cellene befant seg i en spesifikk fase. Cellene var tydelig preget av sorteringen. Foci var mindre distinkte og bildende egnet seg ikke til kvantitativ

analyse, men ga svar på om CKS2 var til stede i alle fasene. Dermed vises bare de sammenlagte bildene av CKS2(FITC) og DNA(TO-PRO-3) fra disse forsøkene.

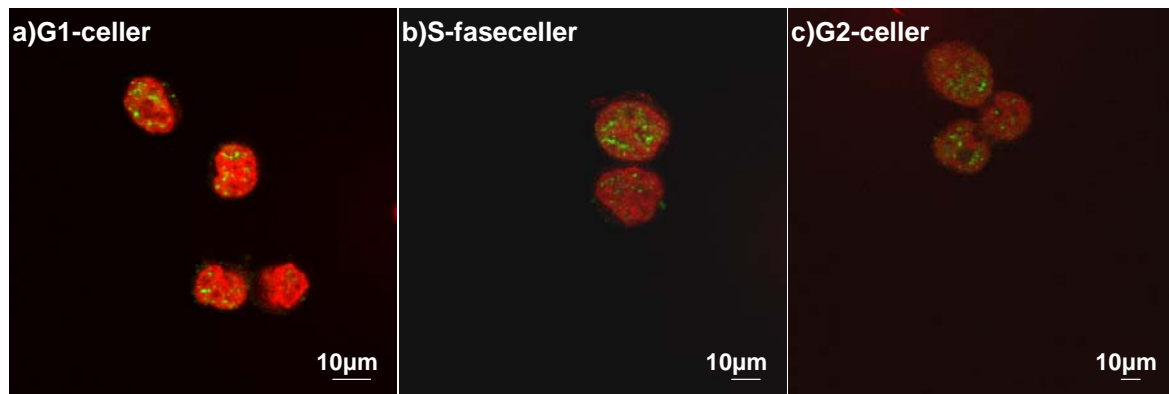
CKS2 ble detektert i alle cellesyklusfasene i de intakte HeLa som vist på figur 4.3-1.



Figur 4.3-1. Deteksjon av CKS2 (FITC) i grønt og DNA (TO-PRO-3) i rødt i midtsnittet av sorterte intakte HeLa. a-c)CKS2 er hovedsakelig assosiert med kjernen, som foci i G₁-, S-, og G₂- fase. d)CKS2-foci er hovedsakelig lokalisert i cytoplasma i M-fase.

I G₁-, S- og G₂-fase var CKS2-foci ansamlet hovedsaklig i kjernen som vist i figur 4.3-1. I M- fase var CKS2-foci hovedsakelig lokalisert i cytoplasma. Det ble også detektert diffust fordelt CKS2 i interfase og M-fase

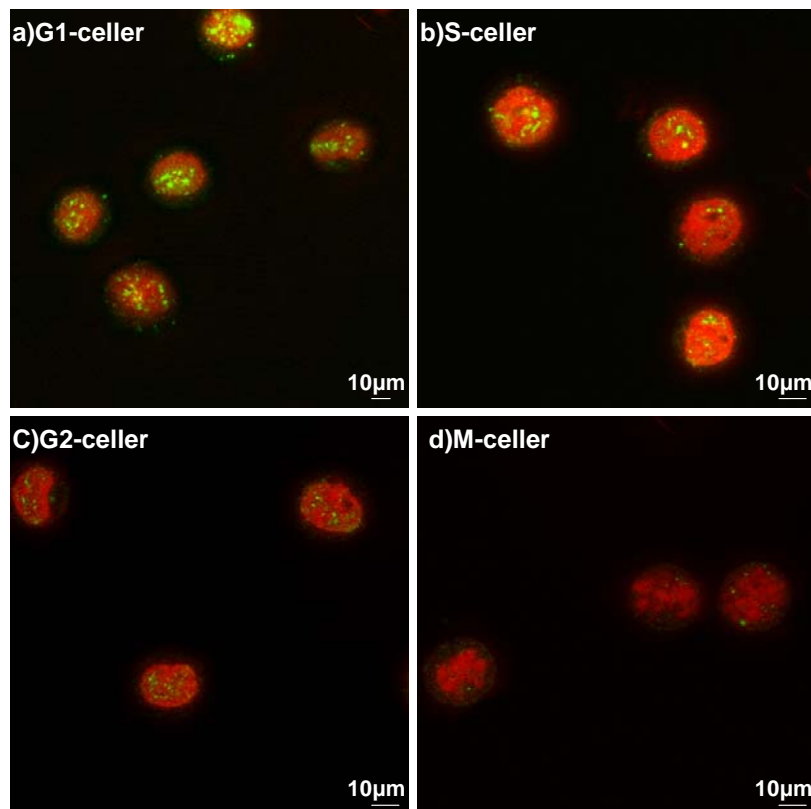
Deteksjonsmønsteret for de ekstraherte HeLa-cellene var svært lik de intakte HeLa-cellenes deteksjonsmønster. Proteinet var assosiert med kjernen i G₁-, S- og G₂-fase som vist på midtsnittsbildene i figur 4.3-2. Men cellekjernens form var irregulær og ikke lenger like rund som for de intakte HeLa-cellene.



Figur 4.3-2. Deteksjon av CKS2 (FITC) i grønt og DNA (TO-PRO-3) i rødt i midtsnittet av sorterte, ekstraherte HeLa. a-c) CKS2 er hovedsakelig assosiert med kjernen, som foci i G_1 -, S-, og G_2 -fase

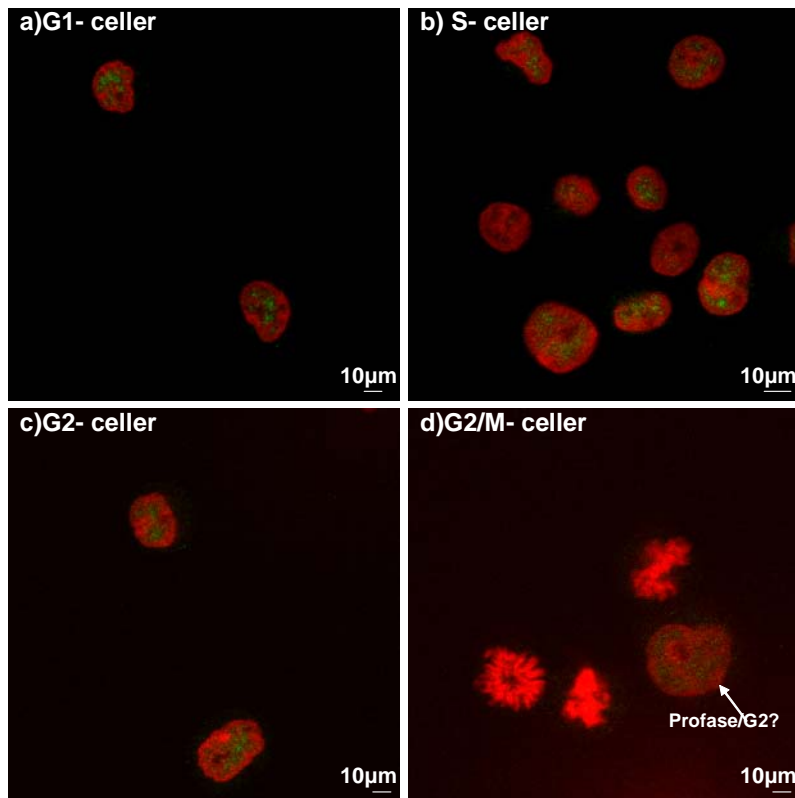
4.3.2 Deteksjon av CKS2 i ulike cellesyklusfaser i SiHa

CKS2 ble detektert i alle interfasecellene i de intakte SiHa-cellene som vist i figur 4.3-3, dermed ble det ikke funnet en spesifikk interfase der cellene var CKS2-negative. CKS2 var assosiert med kjernen i interfase i foci. I M-fase var CKS2-foci ikke assosiert med kjerneområdet som vist på midtsnittsbildet i figur 4.3-3d, men lokalisert i cytoplasma. Det ble detektert diffust fordelt CKS2 i alle cellesyklusfasene.



Figur 4.3-3. Deteksjon av CKS2 (FITC) i grønt og DNA (TO-PRO-3) i rødt i sorterte, intakte SiHa. (a-c) CKS2 er assosiert i kjernen i interfase. d) I M-fase er proteinet lokalisert i cytoplasma, og det er en kraftig reduksjon i CKS2-nivået i forhold til nivået i interfase.

De ekstraherte SiHa interfasecellene var som de ekstraherte HeLa cellene irregulære som vist i figur 4.3-4. CKS2-proteinet ble detektert i alle interfaser, mens i M- fase var det vanskelig å detektere proteinet. CKS2-foci var assosiert med kjernen i G_1 -, S og G_2 -fase som vist på midtsnittsbildene i figur 4.3-4. Det ble også detektert CKS2 diffust fordelt i hele cellen i interfase.



Figur 4.3-4 Deteksjon av CKS2 (FITC) i grønt og DNA (TO-PRO-3) i rødt i sorterte, ekstraherte SiHa. (a-c) CKS2 er assosiert med kjernen i interfase. d) I M- fase er CKS2 er så vidt detekterbar, bortsett fra den ene cellen som har kjernehylsteret intakt og kan være en sen G₂- celle eller en profase celle.

Det ble detektert celler med kjernemembranen i behold blant de sorterte mitosene. Et eksempel er den CKS2-positive cellen i figur 4.3-4d. Alle disse cellene var CKS2-positive.

5. Diskusjon

Metode

5.1.1 Modellsystemet

Cellelinjer dyrket i laboratoriet kan være noe annerledes enn celler i en kreftsvulst i kroppsvevet, der det ofte kan være begrenset tilgang på oksygen og næringsstoffer. Dette kan blant annet påvirker genuttrykket, og dermed også proteinuttrykket [69]. HeLa og SiHa ble dyrket på laboratoriet, noe som kan ha endret HeLa- og SiHa- cellene fra de opprinnelige kreftcellene.

DNA-indeksen/ploiditeten på 1,70 og 1,52 som ble funnet for HeLa og SiHa var høyere enn for de diploide Reh-cellene [70]. Dermed var DNA-indeksen for HeLa og SiHa også høyere enn i normale celler. Dette stemmer overens med hva som er vanlig for livmorhalskreft i pasienter, og indikerer at modellsystemet var representativt for krefttypen [71, 72].

5.1.2 Fiksering og farging av cellene

Begge cellelinjene ble fikserte med to ulike metoder for å kunne detektere og lokalisere CKS2 i intakte og ekstraherte celler. Det ble antatt at metanolfikserte celler var intakte, mens celler tilsatt en detergentbuffer før fikseringsprosedyren var ekstrahert hovedsakelig for membranproteiner og proteiner festet i cytoplasma. Dermed vil proteiner som flyter løst i cytoplasma og ikke er bundet til strukturer eller komplekser kunne ekstraheres fra cytoplasma. Detergentbufferen som ble anvendt lyserte cellene slik at suspensjonen som ble fiksert besto av cellekjerner med lyserte cellemembraner [64]. Det er i flere studier vist at proteiner som er bundet i kjerneområdet i intakte celler ekstraheres ut i en eller flere faser ved bruk av samme detergent (Nonidet-P40) [73, 74]. Metanol er et polart løsemiddel og kan ha fjernet noen lipider fra cellemembranen, og gjort cellene mer permeable enn før fiksering. Det var derfor en mulighet for at enkelte proteiner også kan ha blitt ekstrahert ut i intakte celler. Dette kan forklare det store standardavviket i CKS2-nivået i M- fase, og den svake reduksjonen av CKS2-nivået i SiHa i M-fase.

Fosforylert histon-H3 (PH3) ble brukt som mitosemarkør i denne masteroppgaven. Anti-PH3 er et antistoff som merker fosforylert histon- H3 hovedsakelig i M-fase, og er vist å binde spesifikt i serin-10 setet [75-77]. De mitotiske cellene ble definert ut fra binding til dette antistoffet i forsøk der flowcytometri ble brukt. Histoner pakker DNA til kromatiner. Fosforylering av histon-H3 på serin-10 setet er vist å være korrelert med kromatinkondenseringen som starter i G₂/M-faseovergangen og avsluttes like før telofase [78, 79]. Anti-PH3 er i en studie vist å binde til mitotiske celler fra profase til telofase, men i veldig liten grad til interfasecellene[75]. Ved å måle mengden syklin-A- og syklin-B-antistoff bundet i cellene ble det vist at tre ganger så mye anti-PH3 var bundet til mitosene (metafase til telofase) i forhold til i G₂-fase. Et fåtall av cellene som ble identifisert som mitoser i flowcytometriforsøkene var dermed sene G₂-faseceller, og telofasecellene var antakeligvis ikke skilt fra interfase. Men telofase var lett å skille fra interfase, og andre mitosefaser i de usorterte cellene, på bakgrunn av sin distinkte morfologi. Celler som ble detektert på objektglasset for mitosene etter cellesortering, og ikke hadde en knudrete morfologi, kan ha vært i profase eller G₂-fase.

5.1.3 Konfokalmikroskopi på sorterte celler

Cellene ble sorterte for å lokalisere CKS2 i ulike faser av cellesyklus, og undersøke om det var en spesifikk fase der cellene var CKS2-negative. Det ble sortert et begrenset antall celler på grunn av den store væskemengden som fulgte med cellene under cellesorteringen på objektglassene. Objektglassene bestående av usorterte celler hadde en høyere cellekonsentrasjon. Disse objektglassene inneholdt dermed flere CKS2-negative celler, og kan ha bidratt til at CKS2-negative celler ble detektert blant de usorterte cellene.

Etter cellesortering var cellene i dårligere forfatning og foci var ikke lenger like distinkte som i de usorterte cellene. Disse bildene ble dermed ikke anvendt til kvantitativ analyse.

Mitosene sortert fra de ekstraherte HeLa-cellene ble fragmenterte i små og store, sammensatte cellefragmenter. Bildene av disse mitosene var ikke lenger representative for ekstraherte mitoseceller, og er derfor ikke blitt vist i denne oppgaven. Fragmenteringen kan skyldes metoden der cellene blant annet utsettes for sorteringspulsen som lader cellene i flowcytometeret under sorteringen. En annen faktor som skilte de sorterte cellene fra de usorterte, var tørkingen av de sorterte cellene før tilsetning av DNA-fargestoffet, TO-PRO-3 i

en antifadøløsning. De usorterte cellene var allerede farget med TO-PRO-3 før de ble satt på objektglasset.

5.2 Biologi

5.2.1 CKS2-innhold gjennom cellesyklus i HeLa og SiHa

Total CKS2-mengde ble funnet ved bruk av flowcytometri, og det ble vist at denne mengden økte fra G₁- til og med G₂- fase, med en tilnærmet dobling av CKS2-mengden i både intakte og ekstraherte celler. Dette er i samsvar med doblingen av DNA-innhold og cellestørrelse fra G₁- til G₂-fase i prolifererende celler. For intakte celler var total CKS2-mengde tilnærmet lik for M- og G₂-fase. Konsentrasjonen av CKS2 var dermed konstant. I ekstraherte celler derimot ble det detektert en reduksjon i CKS2-mengden i M-fase både i HeLa og SiHa. CKS2-mengden i mitosene ble redusert til G₁-nivå, noe som tilsvarte halvparten av den CKS2-mengden som ble detektert i G₂-fase i de intakte cellene. Resultatet indikerer at omlag halvparten av proteinmengden kan ha blitt ekstrahert ut i M-fase, og at det dermed har skjedd en endring i lokalisasjonen eller konformasjonen i CKS2-proteinet fra G₂- til M-fase.

5.2.2 Lokalisasjon av CKS2 i HeLa og SiHa

CKS2-proteinet ble lokalisert i usorterte og sorterte HeLa og SiHa ved bruk av konfokal laserskanning mikroskopi. I interfasecellene ble CKS2 lokalisert i foci i kjernen i begge cellelinjene, men det ble ikke detektert foci i nukleoli. Dette gjaldt både intakte og ekstraherte celler, noe som kan indikere at CKS2 var assosiert i kjernen i interfase. Det var en stor variasjon i antallet foci i midtsnittsbildene mellom de ekstraherte cellene, og noen av cellene var til og med negative for CKS2. Noe CKS2 var også diffust fordelt.

Etter cellostering ble det bekreftet at CKS2 var lokalisert som foci i kjernen i G₁-, S-, og G₂-fase, i intakte og ekstraherte HeLa- og SiHa-celler. Dette kan tyde på at CKS2-foci var assosiert med kjernen gjennom hele interfase. Andre proteiner involvert i cellesyklus er vist å være bundet i kjernen i enkelte cellesyklusfaser [73, 74]. DNA-polymerase- α ble vist å være bundet i kjernen i S- fase, og RB1-proteinet ble i den andre studien vist å være bundet i kjernen i tidlig G₁- fase. Den samme detergenten, Nonidet-P40 ble brukt til ekstraksjon av

cellene i disse studiene. CKS2-foci i interfasecellene kan muligens ha vært for store for ekstraksjon med ekstraheringsmetoden anvendt i denne masteroppgaven, selv om forholdsvis store proteiner har blitt detektert ubundet i ekstraherte celler i tidligere funn der Nonidet-P40 er brukt som detergent [73, 74]. Det er derfor ikke mulig å avgjøre om CKS2-foci var bundet eller ubundet til strukturer eller store komplekser i kjernen i interfase,

Det er kjent at CKS2 kan bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset i overgangen mellom G₂- og M-fase [5, 6]. Bindingsaffiniteten av CKS2 til syklin-B1/CDK1-komplekset avhenger blant annet av syklin-B1-konsentrasjon, og om CDK1 er fosforylert i Thr161-setet [45]. Syklin-B1/CDK1-komplekset blir dannet i S-/G₂-overgangen [21]. CDK1 aktiveres ved fosforylering av Thr161. Dermed må CDK1 være aktivert for at CKS2 effektivt skal bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset. Det er kjent at syklin-B1/CDK1-komplekset aktiveres ved at inhiberende fosfatgrupper fjernes fra komplekset [21]. Denne aktiveringen foregår i cytoplasma i interfase [80, 81]. Deretter lokaliseres komplekset til kjernen i sen profase, der komplekset begynner å fosforylere sine substrater og delta i M-fase. CKS2 som ble funnet i foci i G₂-fase i denne masteroppgaven var dermed antakeligvis ikke bundet til syklin-B1/CDK1-komplekset. Dette kan tyde på at CKS2 i foci i ikke bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset. CKS2-proteinets krystallstruktur ble i en studie vist å være en heksamer bestående av to dimere [40]. Heksameren ble vist å kunne bindes til seks CDK1-molekyler i et modellsystem. Den nevnte studien indikerte også at CKS2 muligens kan ha en evne til å modifisere sin konformasjon, og at proteinets strukturelle status kan påvirke tilgjengeligheten av CKS2. Foci funnet i denne masteroppgaven kan ha bestått av flere heksamerformede CKS2. CKS2 kan ha ulik konformasjonen i G₂-fase i HeLa og SiHa, der det diffust fordelte CKS2 bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset mens CKS2 i foci antakeligvis har en annen funksjon

Det er blitt vist at CKS2 og CKS1 er lokalisert i kjernen og ikke i cytoplasma i immunopresipiterte, maligne lymfocytter[45]. Det ble ikke vist hvilken cellyklusfase de maligne lymfocytene var i, men funnet gir sammen med resultater i denne oppgaven en indikasjon på at CKS2 er lokalisert i kjernen i G₂-fase. CKS2 kan ha en funksjon i G₂-fase i tillegg til å være involvert i G₂-/M-faseovergangen bundet til syklin-B1/CDK1-komplekset. Alternativt kan foci i G₂-fase fungere som lagringsplass for CKS2.

I G₁-, og S-fase var CKS2-foci hovedsakelig lokalisert i kjernen. Det ble detektert diffust fordelt CKS2 også i disse fasene. CKS1 er vist å være involvert i både G₁-/S- overgangen og G₂-/M-overgangen i *Saccharomyces cerevisiae* [35]. Resultatene funnet i denne masteroppgaven tyder på at også CKS2 kan ha en funksjon i G₁-og S-fase, i foci eller som diffust fordelt i cellen. CKS2 i foci også fungere som lagringsplass i G₁-, og/eller S-fase, som i G₂-fase.

CKS2-foci var ikke assosiert i kjerneområdet i prometa-, meta-, og telo-fase. Dette ble funnet for intakte og ekstraherte HeLa- og SiHa-celler. I mitosene var CKS2-foci lokalisert i cytoplasma. Det ble som i interfase også detektert diffust fordelt CKS2 i hele cellen. I flere celler var CKS2 helt fraværende. Dette var spesielt synlig i de ekstraherte HeLa-cellene og kan indikere at proteinet var ekstrahert ut av cellen. CKS1 (homolog) har blitt vist å være lokalisert i kjerneområdet i interfase og til og med profase i planteceller [46]. Etter oppløsning av kjernemembranen i prometafase ble det vist at proteinet var lokalisert i cytoplasma helt til telofase. Dette stemmer overens med resultatene funnet i denne masteroppgaven, og kan tyde på at CKS2 i foci var lokalisert i cytoplasma i M-fase før det dannet foci i kjernen igjen G₁-fase. Reduksjonen i de ekstraherte mitosene i flowcytometriforsøkene skyldes antakeligvis at CKS2 var lokalisert i cytoplasma eller var blitt ekstrahert ut med detergenten som lyserte cellemembranen. I flowcytometeret ble hovedsakelig CKS2 som var igjen i kjerneområdet etter ekstraheringen målt. I mitosene var det hovedsakelig det diffust fordelte CKS2 som var lokalisert i kjerneområdet. Forskjellen i lokaliseringen av CKS2-foci mellom interfase og mitose kan også skyldes at interfaseceller har kjernemembranen i behold, og dermed kan beholde CKS2-foci i kjernen, selv om proteinet ikke nødvendigvis er bundet til kjernen. Konformasjonsendringen antydnet i flowcytometriforsøkene oppsto antakeligvis i kjernen, der CKS2 var hovedsakelig i foci i interfase, men diffust fordelt i mitosene som vist i konfokalmikroskopibildene.

CKS2-genet ble i en klinisk studie vist å være høyere uttrykt i livmorhalskarsinomer sammenlignet med frisk livmorhals [3]. Det er kjent at kreftceller har en høyere S-fasefraksjon enn normale celler. Resultatene fra det nevnte studiet kan indikere at totalinnholdet av CKS2 er høyere i celler med høy S- fasefraksjon enn i friske celler. I en genomisk studie ble det vist at høyt uttrykk av CKS2 førte til dårligere sjanse for progresjonsfri overlevelse [4]. En annen studie har vist at CKS2-uttrykket er korrelert med proliferasjon i maligne- og normale lymfocytter [45]. Resultatene funnet i denne

masteroppgaven, tyder på at CKS2-konsentrasjonen er konstant i G_1 - til G_2 -fase så lenge cellene går i syklus. Dersom CKS2 er lavere i G_0 -celler kan de kliniske resultatene forklares ut i fra høy proliferasjon. Slike forsøk må utføres på andre cellelinjer enn HeLa og SiHa siden disse cellene ikke er i G_0 -fase. Slike forsøk kan for eksempel utføres på normale, ustimulerte fibroblaster fra livmorhalskreftsvulsten, som har celler i G_0 -fase.

6. Konklusjon

Total CKS2-mengde økte fra G₁-til og med G₂-fase med en tilnærmet dobling i CKS2-nivået. Dette er i samsvar med at cellestørrelsen og DNA-innholdet i prolifererende celler, dobles fra G₁-til G₂-fase. I M-fase ble det detektert en reduksjon i CKS2-mengden i de ekstraherte cellene sammenlignet med de intakte cellene. T-testen viste at forskjellen i CKS2-mengden mellom intakte og ekstraherte celler i M-fase var signifikant for HeLa, men ikke for SiHa.

CKS2 ble lokalisert hovedsakelig som foci i kjernen i interfase. I M-fase ble CKS2 lokalisert hovedsakelig i cytoplasma, men fremdeles i foci. Det ble også detektert diffust fordelt CKS2 i hele cellen i interfase og M-fase. Disse funnene gjaldt intakte og ekstraherte HeLa og SiHa. Reduksjonen i de ekstraherte mitosene i flowcytometriforsøkene skyldes antakeligvis at CKS2 var lokalisert i cytoplasma eller var blitt ekstrahert ut med detergenten som lyserte cellemembranen. I flowcytometeret ble hovedsakelig CKS2 som var igjen i kjerneområdet etter ekstraheringen målt. I mitosene var det hovedsakelig det diffust fordelte CKS2, som var lokalisert i kjerneområdet, og dermed dette som ble målt.

Foci funnet i denne masteroppgaven besto antakeligvis av flere CKS2 formet som heksamere. CKS2 kan ha ulik konformasjonen i G₂-fase i HeLa og SiHa, der det diffust fordelte CKS2 bindes til syklin-B1/CDK1-komplekset i G₂-/M-overgangen, mens CKS2 i foci antakeligvis har en annen funksjon. CKS2 i foci kan også fungere som lagringsplass i kjernen i G₁-, S-, og G₂-fase. I M-fase kan CKS2 i foci ha en ukjent funksjon, eller fungere som lagringsplass i cytoplasma.

7. Referanser

1. Bray, F., et al., *Cancer in Norway 2006*, F. Bray, Editor. 2006, Kreftregisteret.
2. *Strålebehandling ved gynekologisk cancer*. [cited; Available from: <http://www.legeforeningen.no/index.gan?id=104018&subid=0>].
3. Wong, Y.-F., et al., *Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray*. International journal of Cancer, 2006. **118**(10): p. 2461-2469.
4. Lyng, H., et al., *Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer*. BMC genomics, 2006. **7**(1): p. 268.
5. Egan, E.A. and M.J. Solomon, *Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3659-67.
6. Patra, D., et al., *The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 36839-42.
7. Crawford, D.F. and H. Piwnica-Worms, *The G(2) DNA damage checkpoint delays expression of genes encoding mitotic regulators*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37166-77.
8. Caspersen, A.F., *Cell cycle distribution and CKS2 protein content in cervical carcinoma cell lines after exposure to ionizing radiation*. 2006, Farmasøytisk institutt: Oslo.
9. Hindhammer, A.K., *Uttrykk av gener involvert i overgangen mellom G2- og M- fase i cellesyklus etter strålebehandling av celler fra livmorhalskreftkarsinomer*. 2006, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo: Oslo. p. 1-84.
10. Sheridan, M.T. and C.M. West, *Ability to undergo apoptosis does not correlate with the intrinsic radiosensitivity (SF2) of human cervix tumor cell lines*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(2): p. 503-9.
11. Alberts, B., et al., *Molecular Biology Of The Cell*, Interfasecellen, Editor. 2002, Garland Science: New York. p. 1462.
12. Pardee, A.B., *The cancer handbook*. 2 ed. Regulation of the cell cycle, ed. M. Alison. 2005, Queen Mary University of London, London, UK: John Wiley & Sons, Inc. 14-24.
13. Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation*. Science, 1989. **246**(4930): p. 603-8.
14. Vagn Jensen, P. and P. Prentø, *Cellebiologi: cellens organisation og livsprosesser*. 2003, København: Gads Forlag. 624 s.
15. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. **36**(3): p. 131-49.
16. Hall, J., Eric, *Radiobiology for the radiologist*. 5 ed. 2000, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

17. Benestad, H. and E. Blichfeldt, *Kompendium i Cellesyklus, Vekst og Differensiering* 1997, Universitetet i Oslo Oslo.
18. Glotzer, M., A.W. Murray, and M.W. Kirschner, *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 132-8.
19. Murray, A., *Cyclin Ubiquitination: The destructive end of mitosis*. Cell, 1995. **81**(2): p. 149-152.
20. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
21. Molinari, M., *Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer*. Cell Prolif, 2000. **33**(5): p. 261-74.
22. Rother, K., et al., *Gene expression of cyclin-dependent kinase subunit Cks2 is repressed by the tumor suppressor p53 but not by the related proteins p63 or p73*. FEBS Lett, 2007. **581**(6): p. 1166-72.
23. Benestad, H. and E. Blichfeldt, *Kompendium i Cellesyklus, Vekst og Differensiering*. 1997, Universitetet i Oslo: Oslo.
24. Lie, A., Kathrine *Humant papillomavirus som årsak til kreftutvikling*. Tidsskrift for Den Norske Lægeforening, 2000. **2771**(6).
25. *DNA ploiditet*. [cited; Available from: <http://www.radiumhospitalet.no/Norsk/Footermeny/Nettstedskart/?module=Art..>].
26. Howard, M.S., 25281 *Practical Flow Cytometry*. 2005: Wiley.
27. Keith W.K. Lo, Y.F.W.M.K.M.C.J.C.B.L.J.S.P.V.W.W.S.N.Z.T., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A multicenter study in China*. 2002. p. 327-331.
28. Cannistra, S.A. and J.M. Niloff, *Cancer of the uterine cervix*. N Engl J Med, 1996. **334**(16): p. 1030-8.
29. Barrantes, I.A., et al., *The cancer handbook*. 2 ed. Female reproductive system, ed. M. Alison. 2007, Queen Mary University of London, London, UK: John Wiley & Sons Ltd. 617-643.
30. Tropé Claes, H.B., Onsrud Mathias *Cytostatikaboken*. 1999, Dahl.O, Christoffersen. T, Kvaløy. S, Baksaas. I.
31. *Celleforandringer i livmorhalsen*. [cited; Available from: www.kreftforeningen.no/vp/multimedia/archive/00004/celleforandringer-A5i_4415a.pdf].
32. Kåresen, R. and E. Wist. *Livmorhalskreft* *Hos mange oppdages livmorhalskreft på et tidlig stadium. Årsaken til det er at mange kvinner i Norge følger screening-programmet, og tar celleprøver jevnlig*. [Informasjonskilde om kreft] 2007 [cited; Available from: http://www.kreftforeningen.no/portal/page?_pageid=35,3018&_dad=portal&_schema=PORTAL&navigation1_parentItemId=2448&navigation2_parentItemId=2448&navigation2_selectedItemId=2017&_piref35_3023_35_3018_3018_sectionId=293].

-
33. Source Genepage for Gene Cks2. [cited; Available from: <http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>.
 34. Pines, J., *Cell cycle: Reaching for a role for the Cks proteins*. Current Biology, 1996. **6**(11): p. 1399-1402.
 35. Tang, Y. and S.I. Reed, *The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in Saccharomyces cerevisiae*. 1993. p. 822-832.
 36. Patra, D. and W.G. Dunphy, *Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control*. Genes Dev, 1996. **10**(12): p. 1503-15.
 37. Richardson, H.E., et al., *Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe*. Genes Dev, 1990. **4**(8): p. 1332-44.
 38. Brizuela, L., G. Draetta, and D. Beach, *p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase*. The EMBO Journal, 1987. **6**(11): p. 3507-3514.
 39. Draetta, G., et al., *Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by cdc2+ and suc1+*. Cell, 1987. **50**(2): p. 319-325.
 40. Parge, H.E., et al., *Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control*. Science, 1993. **262**(5132): p. 387-95.
 41. Myer, D.L., E.M. Bahassi, and P.J. Stambrook, *The Plk3-Cdc25 circuit*. Oncogene, 2005. **24**(2): p. 299-305.
 42. Murray, A.W., *Recycling the cell cycle: cyclins revisited*. Cell, 2004. **116**(2): p. 221-34.
 43. Patra, D. and W.G. Dunphy, *Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase- promoting complex at mitosis*. Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2549-59.
 44. Poon, R.Y. and T. Hunter, *Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin*. Science, 1995. **270**(5233): p. 90-3.
 45. Urbanowicz-Kachnowicz, I., et al., *ckshs expression is linked to cell proliferation in normal and malignant human lymphoid cells*. Int J Cancer, 1999. **82**(1): p. 98-104.
 46. Hepler, P.K., F.J. Sek, and P.C. John, *Nuclear concentration and mitotic dispersion of the essential cell cycle protein, p13suc1, examined in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2176-80.
 47. Spruck, C.H., et al., *Requirement of Cks2 for the First Metaphase/Anaphase Transition of Mammalian Meiosis*. Science, 2003. **300**(5619): p. 647-650.
 48. *Celledyrking labøvelse nr.2*. [cited; Available from: folk.ntnu.no/bstokke/Sif4070/CellLab.pdf -.
 49. Becton and Dickinson, *Introduction to Flowcytometry- A learning guide*, Becton Dickinson and Companies.
 50. *Fluorescence Spectra Viewer*. [cited; Available from: <http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>.
 51. Becton and Dickinson, *LSR-II Users Guide*, Becton Dickinson and Companies

-
52. Melamad, M., et al., *Cytometry Part A*. 3 ed, ed. D. Zbigniew, H. Crissman, and J. Robinsen. 2001, San Diego: Academic Press.
 53. Landsverk, K.S., *Flowcytometri - fra basalforskning til klinikk* Bioingeniøren-Tidsskrift for NITO Bioingeniørfaglig institutt, 2006(2): p. 13-16.
 54. Watson, J.V., *Introduction to flow cytometry*. 1991, Cambridge: Cambridge University Press. xvi, 443 s.
 55. Harboe, M. and J.B. Natvig, *Medisinsk immunologi*. 1990, Oslo: Stiftelsen medisinsk immunologi. 349 s.
 56. Hibbs, A.R., *Confocal microscopy for biologists*. 2004, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. XIII, 467 s.
 57. Zucker, R.M. and O. Price, *Evaluation of confocal microscopy system performance*. *Cytometry*, 2001. **44**(4): p. 273-94.
 58. universitet, S. *Konfokal mikroskopi*. [cited; Available from: www.iob.uio.no/.../celler/teknikk/konfomik.html].
 59. Conchello, J.A. and J.W. Lichtman, *Optical sectioning microscopy*. *Nat Methods*, 2005. **2**(12): p. 920-31.
 60. Schindler, L., et al., *Understanding Cancer and Related Topics Understanding The Immune System*. 2004, Nationale Cancer Institute.
 61. *HeLa*. [cited; Available from: <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm>].
 62. *SiHa*. [cited; Available from: <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm>].
 63. *Coulter counter*. [cited; Available from: <http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?Coulter+counter>].
 64. Larsen, J.K., et al., *Flow cytometric discrimination of mitotic cells: resolution of M, as well as G1, S, and G2 phase nuclei with mithramycin, propidium iodide, and ethidium bromide after fixation with formaldehyde*. *Cytometry*, 1986. **7**(1): p. 54-63.
 65. Zigang Dong, A.M.B., *The role of histone H3 phosphorylation (Ser10 and Ser28) in cell growth and cell transformation*. 2006. p. 416-421.
 66. Matsuo, Y. and H.G. Drexler, *Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines*. *Leukemia Research*, 1998. **22**(7): p. 567-579.
 67. Paoletti, A., et al., *Pulse treatment of interphasic HeLa cells with nanomolar doses of docetaxel affects centrosome organization and leads to catastrophic exit of mitosis*. *J Cell Sci*, 1997. **110** (Pt 19): p. 2403-15.
 68. Abu-Absi, N.R. and F. Srienc, *Instantaneous evaluation of mammalian cell culture growth rates through analysis of the mitotic index*, in *Journal of Biotechnology*. 2002. p. 63-84.
 69. Denko, N., et al., *Epigenetic Regulation of Gene Expression in Cervical Cancer Cells by the Tumor Microenvironment*. 2000. p. 480-487.

-
70. Rosenfeld, C., et al., *Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line*. Nature, 1977. **267**(5614): p. 841-3.
 71. Jakobsen, A., *Ploidy level and short-time prognosis of early cervix cancer*. Radiother Oncol, 1984. **1**(3): p. 271-5.
 72. Jakobsen, A., *Prognostic impact of ploidy level in carcinoma of the cervix*. Am J Clin Oncol, 1984. **7**(5): p. 475-80.
 73. Stokke, T., et al., *Cell cycle-specific expression and nuclear binding of DNA polymerase alpha*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(6): p. 3384-9.
 74. Stokke, T., et al., *The retinoblastoma gene product is bound in the nucleus in early G1 phase*. Exp Cell Res, 1993. **204**(1): p. 147-55.
 75. Juan, G., et al., *Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis*. Cytometry, 1998. **32**(2): p. 71-7.
 76. Juan, G., F. Traganos, and Z. Darzynkiewicz, *Histone H3 Phosphorylation in Human Monocytes and during HL-60 Cell Differentiation*. Exp Cell Res, 1999. **246**(1): p. 212-220.
 77. Zigang Dong, A.M.B., *The role of histone H3 phosphorylation (Ser10 and Ser28) in cell growth and cell transformation*. 2006. p. 416-421.
 78. Ajiro, K. and T. Nishimoto, *Specific site of histone H3 phosphorylation related to the maintenance of premature chromosome condensation. Evidence for catalytically induced interchange of the subunits*. 1985. p. 15379-15381.
 79. Hendzel, M.J., et al., *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. Chromosoma, 1997. **106**(6): p. 348-60.
 80. Takizawa, C.G. and D.O. Morgan, *Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C*. Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**(6): p. 658-665.
 81. Jackman, M., et al., *Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 143-148.
 82. Willem E. Corver, L.A.K.J.v.d.A.M.R.G.J.F.C.J.C., *Four-color multiparameter DNA flow cytometric method to study phenotypic intratumor heterogeneity in cervical cancer*. 2000. p. 96-107.
 83. Tavecchio, M., et al., *Multi-parametric flow cytometric cell cycle analysis using TO-PRO-3 iodide (TP3): Detailed protocols*. Acta Histochemica. **In Press, Corrected Proof**.

8. Vedlegg

Vedlegg 1: Protokoll for celledyrking

Vedlegg 2: Protokoll for splitting av celler

Vedlegg 3: Protokoll for celletelling med coulter counter

Vedlegg 4: Protokoll for metanolfiksering av celler

Vedlegg 5: Protokoll for fiksering av celler ved ekstraksjon før metanolfiksering

Vedlegg 6: Protokoll for preparering og farging av fikserte celler til Flowcytometri

Vedlegg 7: Protokoll for å kjøre flow og analysere celleprøvene

Vedlegg 8: Protokoll for ploiditetsmåling.

Vedlegg 9: Protokoll for å utføre t-test ved bruk av Sigmastat

Vedlegg 10: Protokoll for farging av celler til konfokalmikroskopi

Vedlegg 11: Protokoll for cellesortering for konfokalmikroskopet

Vedlegg 12: Protokoll for bruk av konfokalmikroskopet

Vedlegg 13: Reagenser anvendt i forsøkene i masteroppgaven

Vedlegg 1

Protokoll for celledyrking

1. Tar cryorør med mykotestet celler fra fryser -80°C.
2. Cryorør tines på vannbad.
3. Cellene suspenderes i 5 ml medium tilsatt kalveserum, penicillin/streptomycin og L-glutamin og puttes i 15ml rør.
4. Sentrifuger ved 1500rpm i 4 minutter.
5. Supernatanten suges av med pasteurpippette festet til sug.
6. Cellepellet resuspenderes i 20 ml medium og overføres til merket T75 celleflaske.
7. Inkuberes i CO2 inkubatoren.

Medium anvendt i alle forsøkene besto av:

-DMEM medium

-1% Penicillin/streptomycin

-1% L-glutamin

-10 % kalveserum

Vedlegg 2

Protokoll for splitting av celler

1. Sett PBS, trypsin EDTA og medium på vannbad
2. Se på cellene i mikroskop og finn ut hvor stor plass de trenger.
Trinnene som følger utføres i en LAF benk med aseptiske metoder.
3. Sug av gammelt medium med pasteurpippette uten filter.
4. Vask cellen med 5ml PBSx2.
5. Tilsett 1ml trypsin og kontroller at den dekker hele flasken.
6. Inkuber i 5minutter i CO2 inkubatoren.
7. Slå forsiktig på siden av flaskene.
8. 5ml medium tilsettes og innholdet av to T75 flasker overføres til et rør.
9. Sentrifuger ved 1500 rpm/min i 3minutter.
10. Sug av supernatanten.
11. Resuspender pelleten i 10 ml medium.
12. 2ml overføres til hver T75 flaske og tilsett 18ml medium til hver T75 flaske.

Vedlegg 3

Protokoll for celletelling med coulter counter

1. Lager en 40x fortynning ved å tilsette 0,5 ml prøve i 19,5 ml fysiologisk saltvannsoppløsning.
2. Slår på skjermen og PC.
3. Slår på pumpe, lampe og on off bryteren.
4. Setter i propp.
5. Innlogging.
6. Trykk Ctrl+F3 for å fjerne gammel data.
7. Kontroller at ventilen ikke er tettet.
8. Kontroller at gain er på 2
9. Bland prøveløsningene godt med maskinens propell,
10. Skru på ventilen og se at sølvstrålen går helt tilbake.
11. Skru av ventilen og trykk F2.
12. Trykk F2 når alle celler er telt.
13. Trykk F8 for å skrive ut resultatene.

Vedlegg 4

Protokoll for metanolfiksering av celler

1. Sett medium, trypsin EDTA og PBS på vannbad.
2. Se på cellene i mikroskopet.
3. Sug av gammelt medium med en pasteurpippette koblet til sug.
4. Vask cellene to ganger med PBS.
5. Tilsett 1 ml trypsin EDTA til hver flaske.
6. Slå sammen alle flaskene til 50 ml flaske.
7. Tilsett 4x2 ml medium for hver T75.
8. Sentrifuger i 5 minutter på 1100 rpm/min.
9. Sug av supernatanten med en pasteurpippette festet til sug.
10. Resuspender pelleten i 50 ml
11. Ta ut 0,5 ml prøve og bland det med 19,5 ml natriumklorid oppløsning.
12. Tell cellene med Coulter counter.
13. Fordel i riktig antall rør i forhold til celleantall.
14. Sentrifuger i 5 minutter på 1100 rpm/min
15. Sug av supernatanten.
16. Tilsett 2 ml 100% metanol til cellepelleten.
17. Alle cellene skal være suspendert i metanolen.
18. Pipetter opp og ned for å homogenisere blandingen.
19. Transporter flaskene til fryseren umiddelbart.

Vedlegg 5

Protokoll for fiksering av celler ved ekstraksjon før metanolfiksering

1. Sett røret som inneholder cellepelletten på is.
2. Tilsett 3 ml detergentbuffer
3. Resuspender cellepelletten ordentlig ved bruk av en pippetboy.
4. La stå på is i 5 minutter.
5. Tilsett 1 ml av 4 % formaldehyd løsning som gir en endelig konsentrasjon på 1%.
6. La stå på is 1 time [38;39;45].
7. Sentrifuger røret ved 1100 rpm/min i 5 minutter
8. Sug av supernatanten med en pasteurpipette festet til sug.
9. Følg prosedyren for metanolfiksering

Detergentbufferen inneholdt:

-0,1% Nonidet P40

-6,5mM Na₂HPO₄

-2,7mM KCl

-137 mM NaCl

-0,5mM EDTA

pH=7,2

Vedlegg 6

Protokoll for preparering og farging av fikserte celler til Flowcytometri

Trinn 1-6 må utføres ved 0°C (fargingen) og sentrifugeres i 10 minutter ved 1100 rpm/min.

- 1) Vei opp 4% fettfri melkepulver. (i 5000µL er det 0.2g).Lag detergentbufferen med 4% fettfri melk.
- 2) Detergentbufferen med fettfri melk settes på varmebad i 1time. Sentrifuger detergentbufferen ved 1700rpm/min i 3-4 minutter. Bruk kun supernatanten til å lage antistoffløsningene med.
- 3) Fordel celleprøvene i 2 falconrør. En av disse er hovedprøven som brukes for å finne mengde CKS2. En annen brukes for å måle uspesifikk binding av FITC.
- 4) Sentrifuger alle prøverørene og fjern metanolen med en pasteurpippette.
- 5) Resuspender celleprøvene i 3ml PBS med temperatur på 2-8°C. OBS!: For varm PBS vil føre cellene i sjokk pga temperatur forskjell mellom celler og PBS og en mister celler.
- 6) Sentrifuger ved 1700rpm/min i 3 min.
- 7) Gjenta vask med PBS.
- 8) Cellene prepareres som anvist i tabell 1-3. En parallell fra hver prøve gjennomgår hver av metodene.
- 9) Løsning 1 og 2 lages samtidig (mens cellene ovenfor sentrifugeres) og løsning 3 og 4 lages samtidig (mens prøvene står på is).

Løsning 1: Lag en antistoffløsning bestående av 0,5 mg/ml mus anti- CKS2 i detergentbuffer.

Løsning 2: Lag en antistoffløsning bestående av 2 µg/ ml kanin anti- PH3 i detergentbuffer.

Løsning 3:Lag en antistoffløsning bestående av 40 µg/ ml FITC konjugert geit anti- mus i detergentbuffer.

Løsning 4: Lag en antistoffløsning bestående av 8 µg/ ml PE konjugert geit anti- kanin i detergentbuffer.

Løsning 5: Lag en løsning bestående av 2,4µl/ml Hoechst 33258 i PBS.

Tabell 1: for preparering av hovedprøven:

Hovedprøve: Mengde CKS2 protein i cellene	Farging av celler
Hovedprøven tilsettes: <ul style="list-style-type: none">• Mus anti- CKS2• Kanin anti- PH3• FITC geit anti- mus• PE geit anti- kanin• Hoechst 33258	<ol style="list-style-type: none">1. Resuspender pelleten i 50 µl av løsning 1 og 50µl av løsning 2 .2. La stå på is i 30 minutter3. Tilsett PBS og sentrifuger.4. Resuspender pelleten i 50µl av løsning 3 og 50µl løsning 4.5. La stå på is i 30 minutter med aluminiumsfolie over.6. Vask med PBS7. Tilsett 700 µl løsning 5.

Tabell 2: for preparering av kontrollprøven:

Kontrollprøve: Måler uspesifikk binding av FITC konjugert antistoff	Farging av celler
Kontrollprøven tilsettes: <ul style="list-style-type: none">• Kanin anti-PH3• FITC geit anti- mus• PE geit anti- kanin.• Hoechst 33258	<ol style="list-style-type: none">1. Resuspender pelleten i 100 µl av løsning 2.2. La stå på is i 30 minutter.3. Tilsett PBS og sentrifuger4. Resuspender celle pelleten i 50µl løsning 3 og 50µl løsning 4.5. La stå på is i 30 minutter med aluminiumsfolie over.6. Vask med PBS7. Tilsett 700 µl løsning 5.

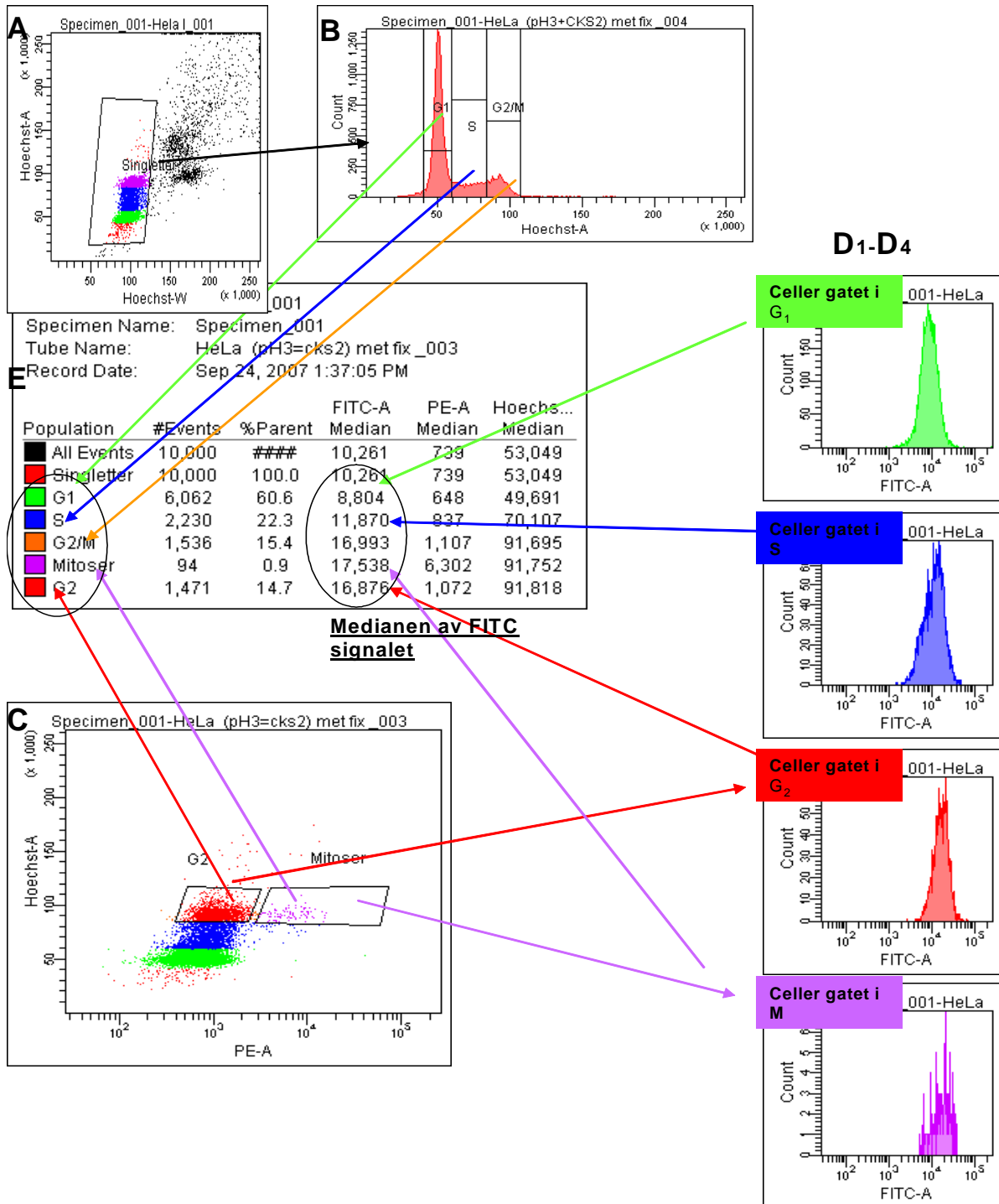
Tabell 3:konsentrasjoner og fortynninger av antistoffer anvendt:

Antistoffer:	Mus- anti- CKS2	Kanin anti- PH3	FITC	PE	Hoechst 33258
Konsentrasjoner:	0,5 mg/ml	2 µg/ ml	40 µg/ ml	8 µg/ ml	1,5 µg/ ml
Fortynning:	(1:25)	(1:500)	(1:25)	(1:25)	

Vedlegg 7

Protokoll for å kjøre flow og analysere celleprøvene

- 1) Sett terskelverdi for Hoechst på 5000, og høyspenningen for FSC til 400.
- 2) Bruk kalibreringskuler for kompensasjon.
- 3) Kjør en hovedprøve og kontrollprøve for hver cellelinje, både metanolfikserte og ekstraherte celler.
- 4) Tegn et plott som viser areal mot bredden av Hoechst 33258 som vist på figur 1A.
- 5) Sett en gate for å diskriminere de ønskede encellede fra de dublettene i cellepopulasjonen. Se figur 1A.
- 6) Tegn DNA-histogram (-er) som viser antall single celler mot detektert Hoechst 33258 signal. Manipuler spenningen til toppen som representerer G₁-cellene lokaliseres på kanal nummer 50. Dette gjøres alltid for å ha samme utgangspunkt. Slik blir sammenligninger av ulike forsøk mer representative[8].
- 7) *Gate* for å separere G₁,S og G₂-/M fasene. Se figur 1B.
- 8) Tegn et plott som viser PE signaler versus de fra Hoechst 33258. Separer G₂-fase celler fra M-fase celler. Se figur 1C.
- 9) Tegn histogrammer som viser FITC signalene (CKS2 protein innhold) for hver fase. Se figur 1D.
- 10) Tegn opp de siste hierarkiene (se figur 1E). Anvend FITC-A median tallene som relativt målt verdi av CKS2 protein i rådataanalysen.

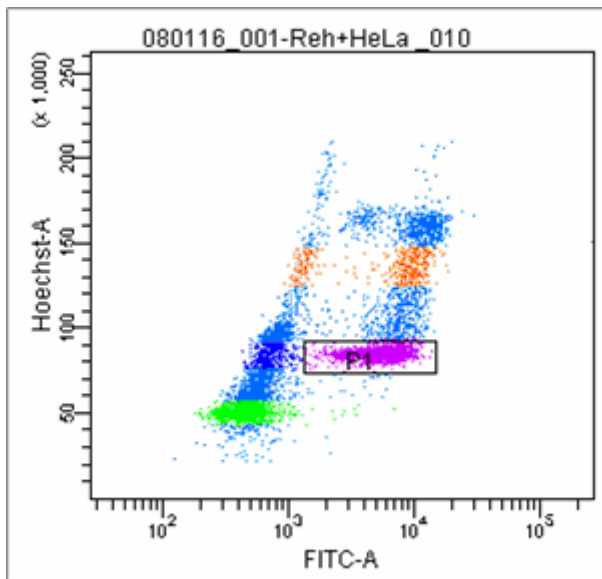


Figur 1. Fasene ble gitt ulike farger på bakgrunn av gatingen i DNA histogrammet på bakgrunn av Hoechst 33258. Dette ga individuelle FITC-histogrammer, og FITC-medianen for hver cellesyklusfase. G₂ og M kunne skilles på bakgrunn av PE farging av histon-H3 i mitosene.

Vedlegg 8

Protokoll for ploiditetsmåling

- 1) Reh celler tilsettes Hoechst 33258 samtidig som de metanolfikserte og ekstraherte cellene.
- 2) La stå til analysen skal utføres.
- 3) Etter flowcytometrianalysen av HeLa og SiHa cellene er utført, blandes 1 ml Reh celler med 1 ml HeLa eller SiHa celler.
- 4) Tilsett 1 ml Hoechst 33258 til blandingen.
- 5) Vortex røret forsiktig.
- 6) La stå i 5-10 min.
- 7) Kjør prøvene.
- 8) Gate inn G_1 - toppene.
- 9) Gi G_1 - toppen for hver cellelinje en benevnning slik at det er lett å skille.
- 10) Gate inn G_1 for hver av cellepopulasjonen i dottplottet som vist i figur 2 og figur 3.
- 11) Dette gir dataene som er nødvendig som vist i tabellen under.
- 12) Sett dataene inn i formel 4 og beregn ploiditet.



Figur 2. G_1 toppen for HeLa cellene er gatet inn på dottplottet. Dette gir oss data på medianen av antall G_1 celler i HeLa der det kan være vanskelig å gate i DNA histogrammet.

Figur 3. Fjerde kolonne viser data for G_1 - cellene i Reh som G_1 og data for G_1 - cellene i HeLa som P1.

Experiment Name: mojgan080116					
Specimen Name: 080116_001					
Tube Name: Reh+HeLa_010					
Record Date: Jan 16, 2008 2:58:36 PM					
Population	#Events	%Parent	FITC-A Median	PE-A Median	Hoechst-A Median
All Events	10,000	####	709	85	79,422
Singletter	10,000	100.0	709	85	79,422
G1	3,779	37.8	402	36	49,799
S	2,727	27.3	4,741	278	84,612
G2/M	418	4.2	8,458	543	136,964
P1	2,265	22.7	5,253	329	84,712

Vedlegg 9

Protokoll for å utføre t-test ved bruk av Sigmastat

- 1) Bruk programmet Sigma Stat 3,5.
- 2) Klipp ut og lim inn data fra Excel.
- 3) Gå inn på "Statistics" og deretter "Compare two groups" i rullemenyen.
- 4) Gå inn på t-Test på rullemenyen.
- 5) Velg "Raw" og trykk "Next".
- 6) Merk rader som skal undersøkes for statistisk signifikans (p-verdi skal være under 0.05 for å være signifikant).

Vedlegg 10

Protokoll for farging av celler til konfokalmikroskopi

- 1) Gjør som i Vedlegg 6 punkt 1-7.
- 2) Farg hver cellelinje som beskrevet i tabellene avhengig av om cellene skal sorteres eller ikke før mikroskopi.

Laging av løsning 1-5 utføres som beskrevet i vedlegg 6

Løsning 6: Lag en 500 µl løsning bestående av TO- PRO- 3 med konsentrasjonen 0,5 µM [82, 83] og Rnase med konsentrasjonen 100µg/ml i PBS.

Tabell for farging av celler for mikroskopi:

Prøven tilsettes:
<ul style="list-style-type: none">• Mus- anti CKS2• FITC geit anti- mus• TO- PRO- 3• Rnase A
<ol style="list-style-type: none">1) Tilsett 100µl av løsning 1.2) La stå på is i 30 min.3) Tilsett PBS og sentrifuger prøven.4) Sug av supernatanten med en pasteurpippette.5) Tilsett 100 µl av løsning 3.6) La stå på is i 30 min.7) Tilsett PBS og sentrifuger prøven.8) Sug av supernatanten med en pasteurpippette.9) Tilsett 500 µl av løsning 6.10) La stå i 30-60 min på vannbad ved 37° C.11) Sentrifuger prøvene.12) Sug av supernatanten.13) Tilsett 50 µl antifade.

Tabell for farging av celler for sortering før mikroskopi:

Prøven tilsettes før sortering:
<ul style="list-style-type: none">• Mus- anti CKS2• Kanin anti- PH3• FITC geit anti- mus• PE geit anti- kanin• Hoechst 33258• TO- PRO- 3• Rnase A
<ol style="list-style-type: none">1) Tilsett 50µl av løsning 1 og 50 µl av løsning 2.2) La stå på is i 30 min.3) Tilsett PBS og sentrifuger prøven.4) Sug av supernatanten med en pasteurpippette5) Tilsett 50µl av løsning 3 og 50 µl av løsning 4.6) La stå på is i 30 min.7) Tilsett PBS og sentrifuger prøven.8) Sug av supernatanten med en pasteurpippette.9) Tilsett 700 µl av løsning 510) La stå i 30-60 min på is.11) Sorter cellene som beskrevet i vedlegg 12.12) Når alle objektglassene er tørre tilsett en dråpe antifade inneholdende 0,5 µM TO-PRO-3.

Tabell over konsentrasjoner og fortynninger:

Antistoff:	Mus- anti- CKS2	Kanin anti- PH3	FITC	PE	Hoechst 33258	TO- PRO-3	RnaseA
Konsentrasjon	0,5 mg/ml	2 µg/ ml	40 µg/ ml	8 µg/ ml	1,5 µg/ ml	0,5 µM	100 µg/ml
Fortynning:	(1:25)	(1:500)	(1:25)	(1:25)		(1:2000)	(1:200)

Vedlegg 11

Protokoll for cellesortering for konfokalmikroskopi

1. Farg cellene som beskrevet i vedlegg 10.
2. Ulike kalibreringskuler kjøres for å kalibrere maskinen og for å optimalisere at lyset skal treffe prøvestrålen optimalt.
3. Sett inn prøven.
4. Singletter/enkle celler selekteres med en gate på dottplottet som viser arealet av Hoechstsignalet mot bredden av Hoechstsignalet.
5. Deretter selekteres G1-, S-, G2/M-fase ut med gater i DNA histogrammet.
6. Arealet av PEsignalet mot arealet av Hoechstsignalet dottplottet brukes for å skille G2-fra M-fase.
7. Objektglass merkes med cellelinje og fase og settes inn i maskinen.
8. Ulike cellyklusfaser sorteres på de merkede objektglassene, som skal lufttørkes før mikroskopering.
9. Lag en TO-PRO-3 løsningen som beskrevet i vedlegg 10 og tilsett en dråpe.

Vedlegg 12

Protokoll for bruk av konfokalmikroskopet

Klargjøring av mikroskop og skanner

1. Skru på laservifta til høyre under skjermen.
2. Vri om lasernøkkelen til "On", da skal det lyse en gul lampe. Dette er Argon-krypton laseren.
3. Slå på skanner og vri om nøkken for helium-neonlaseren, det skal da lyse gult.
NB! Begge laserne skal stå på i 30 minutter før bruk for å stabilisere seg.
4. Skru på mikroskopet og fluorescenslampen. NB! Lampen skal stå på 30 minutter før bruk for å stabilisere seg.
5. Skru på datamaskinen og skjermene.
6. Åpne opp programmet "Leica TCS NT".
7. Trykk på "Acquire images" på skjermen og still den på ønsket lagret innstilling.
8. Trykk på "Filters" og velg ønsket båndpass og langpass filter.
 - For FITC settes BP på 530/30
 - For TO-PRO-3 settes LP på 590
 - FITC settes på "Green".
 - PE, TO-PRO-3 settes på "Red".
 - Det skal være haket av for "Active" under fargevalg
9. Lagr settingen for forsøket med Save knappen.
10. Nederste hjul foran på mikroskopet skal stå på BF.
11. Trykk på "Mode" og velg X-Y for aksene som skal skannes.
12. Trykk på "Lens" og sett den på 63x1,32 NA oljeimmersjons-objektivet.
Mikroskoplinsen som skal brukes må stemme overens med det som oppgis i dataprogrammet. Dette kan justeres til venstre på mikroskopet.
13. Trykk på "Format" og sett skanningboks-størrelsen til 512x512piksler.
14. Sett pinhole til 1µm.

Mikroskopering for å finne ønskede celler

1. Legg en liten dråpe av prøven på objektglasset, deretter legg et dekkglass forsiktig på prøven for å unngå bobler i preparatet.
2. Sett det preparerte objektglasset fast på mikroskopet og tilsett en liten dråpe immersjonsolje på dekkglasset.
3. FITC gir grønne celler, og for å observere det hjulet som regulerer filternummeret stå på 3
4. TO- PRO-3 gir røde celler og for å se disse skal hjulet stå på filter nummer 2.
5. Spaken øverst til venstre for mikroskopet skal være inne.
6. For å observere reflektert lys sett spaken som slipper lyset inn til 0.
7. Fokuser på cellene du vil skanne i mikroskopet.

Skanning

1. Velg filter nummer 4 når det skal skannes.
2. Spaken til venstre dras ut.
3. Lys slås av når det skal skannes, dermed skal spaken som slipper lys inn settes til 1..
4. Trykk inn "Scan" og zoom inn til ønsket størrelse ved å vri på hjulet bak tastaturet.
5. FITC sees i kanal 1 (Chn1), og TO-PRO-3 sees i kanal 2 (Chn2). Trykk inn begge knappene og "Tiled" for å kunne observere bildet av begge.
6. Juster PMT for ulike fluorescenssignaler slik at signalet blir klart. Dersom du ønsker å fjerne mest mulig støy kan du stille fargene fra "Green" og "Red" til "Glow over" og skanne over. Støyen vil da vises i en annen farge og kan justeres bort ved å justere PMT.
7. Juster det første tverrsnittet som skal avbildes, ved å skru på z- posisjon hjulet til fluorescens så vidt kan detekteres og trykk "Begin".
8. Deretter skrur z-posisjon omvendt vei til fluorescens så vidt kan detekteres, for å angi siste bilde som skal skannes, og trykk "End".
9. Slå av skanningen og velg antall "Sections"(tverrsnitt) og "Accumulations"
10. Trykk på "Series" for å skanne en serie med tverrsnitt av cellene.
11. Trykk på "Gallery" for å se skanningen av tverrsnittet hver for seg på samme side.
12. Trykk "View" og deretter "Projection" for å legge tverrsnittene over hverandre.
13. Lagr bildene ved å trykke inn "Quantify" og deretter "File" og "Save Selected"

15. Skru av maskinen i motsatt rekkefølge av hvordan du slo den på.

Opptak av interferenskontrastbilder

1. Trykk på "Settings", deretter "Preferences" og velg "Panelbox".
2. Velg "PMTT" og "Offsettrans" som to av parametrene i panelboksen.
3. "Offsettrans" bør stå på ≤ -50 .
4. Aktiver "Sample" og velg svart og hvit som farge ved å velge "B/W". Deaktiver FITC-kanalen og TO- PRO-3-kanalen.
5. Sett hjulet under okularet på D istedenfor BF og sett hjulet under på 100 istedenfor H.
6. Trykk inn filteret til høyre for å få gjennomlys.
7. Behold topp og bunn av cellen som ble funnet på fluorescensbildet, men velg 8 akkumulasjoner istedenfor 4.
8. Skann og juster PMTT, når riktig PMTT er funnet ta en serie med skann.

Bruk av bildeanalyseprogrammet "Analysis 5" for å legge sammen midtbilder til kompositt

1. Trykk på "Image" og "Separate" i rullemenyen deretter "Time" i undermenyen.
2. Aktiver midtbildene og trykk deretter på "Image" og "Convert" i rullemenyen, og "Split into Standard" i undermenyen.
3. Aktiver et av midtbildene og trykk på "Image", deretter "Combine fluorescence" i rullemenyen.
4. Aktiver hver og en av de konverterte midtbildene og gi dem ulike farger deretter kryss av i boksen.

Vedlegg 13

Reagenser anvendt i forsøkene i masteroppgaven

Navn	Firma	Konsentrasjon
Dulbecco's Modified Eagles Medium	Sigma	
Dulbecco's PBS uten kalsium og magnesium	PAA	1x
Trypsin-EDTA	Gibco/Invitrogen	1x
Penicillin/Streptomycin	PAA	100x
L-glutamin	PAA	100x
Foetal Bovine Serum (føtalt kalveserum)	Gibco/Invitrogen	
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/ FITC Goat F(ab)' ₂	Dakocytomation	1 g/l
Goat F(ab)' ₂ Anti- Rabbit IgG(H+L) (R-PE-konjugert/ PE-konjugert antistoff)	Caltag/Invitrogen	0,1 mg/0,5ml
Anti-phospho-Histone H3(Ser)Mitosis Marker (rabbit polyclonal IgG)	Upstate	1 µg/µl
Metanol	Rathburn	100%
Formaldehyd løsning	J.T. Baker	37%

Mouse anti-CKS2	Zymed/Invitrogen	0,5 mg/ml
Hoechst 33258	Calbiochem/Merck Biosciences	
TO-PRO-3	Invitrogen/ Molecular Probes	1 mM/ml
RnaseA	Invitrogen	20 mg/ml
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence H- 1000 (Antifade)	Bioteam AS	